

TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI TOIMETISED
УЧЕНЫЕ ЗАПИСКИ
ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА

ALUSTATUD 1893. a.

VIINIK 189

ВЫПУСК

ОСНОВАНЫ в 1893 г.

ТРУДЫ ПО ТКАНЕВОЙ БИОЛОГИИ

I



TARTU 1966

TRANSACTIONS OF THE TARTU STATE
UNIVERSITY
TARTU RIIKLIKU ÜLIKOOLI TOIMETISED
УЧЕННЫЕ ЗАПИСКИ
ТАРТУСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО УНИВЕРСИТЕТА
ALUSTATUD 1893. a. VIINIK 189 ВЫПУСК ОСНОВАНЫ В 1893 г.

~~XVI~~
~~1-9~~ 130

Per.
A-1163

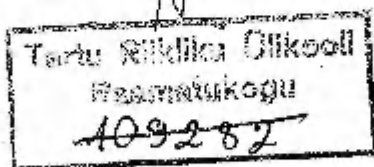
ТРУДЫ ПО ТКАНЕВОЙ БИОЛОГИИ

I

Tartu 1966

Редакционная коллегия

Г. Кингисепп, К. Кырге, Л. Ленцнер, А. Линкберг, Б. Луйк, К. Пыльдвере,
Э. Раудам, Ю. Саарма, Л. Тяхепыльд
Редакторы: К. Пыльдвере и Ю. Кярнер
Ответственный редактор: К. Пыльдвере
Труды по медицине
XIII



ПРЕДИСЛОВИЕ

Настоящий сборник содержит доклады совещания по экспериментальной гистологии, проведенного Центральной медицинской научно-исследовательской лабораторией Тартуского государственного университета и Лабораторией экспериментальной гистологии Института экспериментальной медицины АМН СССР в Тарту с 29 по 30 мая 1964 г.

Гистология в настоящее время переросла границы чисто описательной науки и охватывает все биологические качества тканей. Большую роль в развитии тканевой биологии сыграли работы русских гистологов А. А. Заварзина и Н. Г. Хлопина. Поэтому контакт и тесное сотрудничество с лабораторией, где раньше работали вышеупомянутые ученые и которую в наше время возглавляет ученик Н. Г. Хлопина, проф. В. П. Михайлов, для гистологов Центральной медицинской научно-исследовательской лаборатории ТГУ являются весьма ценными.

В работе совещания, кроме коллектива гистологов ИЭМ-а, принимали участие также представители отделов общей физиологии и патологической анатомии ИЭМ-а во главе с профессорами А. В. Риккль и Ю. М. Жаботинским, а также доцент I Ленинградского им. И. П. Павлова медицинского института А. Г. Бобков.

Доклады конференции были посвящены двум взаимно связанным проблемам тканевой биологии — регенерации и детерминации тканей. Работа конференции показала плодотворность применения и развития принципов советской эволюционной гистологии не только для самой гистологии, но также для физиологии, онкологии и патологической анатомии. В ходе конференции были намечены и обсуждены некоторые задачи дальнейшего развития тканевой биологии.

Одновременно конференция содействовала укреплению дружественных научных связей между Институтом экспериментальной медицины АМН СССР и Тартуским государственным университетом.

Редакторы

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК ПЕРВИЧНЫХ ОДНОСЛОЙНЫХ ТКАНЕВЫХ КУЛЬТУР

Ю. К. Кярнер

Центральная медицинская научно-исследовательская лаборатория
Тартуского государственного университета

Предпосылкой для изучения важных биологических и медицинских вопросов посредством тканевых культур являются сведения о детальной организации клеток в культуре. Для цитологии представляют ценность данные о первичных трипсинизированных тканевых культурах, которые сохраняют во многих аспектах свойства исходных тканей (К. И. Пыльдвере, 1963 а, б), а в то же время являются подходящим объектом изучения и в экспериментальной цитологии. В последние годы, особенно в связи с запросами вирусологии, обращено внимание на цитохимию первичных однослойных культур (С. Я. Залкинд, 1960; С. Я. Залкинд и В. Г. Заславский, 1962; С. Я. Залкинд и Л. Г. Степанова, 1960; В. Г. Заславский, 1960, 1961; В. Г. Заславский и А. М. Амченкова, 1961; Д. М. Левина и Б. В. Жив, 1964; Бизэле и Гольдгабер — Biesele a. Goldhaber, 1955; Генриксен — Henrichsen, 1956; Огава — Ogawa, 1960; Огава и Окамото — Ogawa a. Okamoto, 1960; Огава и др., 1961; Огава и Шинонага — Ogawa a. Shinonaga, 1962; Вент — Wendt, 1961; Такаги и др. — Takagi a. oth., 1961; Фарнс и Баркер — Farnes a. Barker, 1963). Морфологически изучены такие же культуры посредством фазово-контрастной микроскопии (Роуз — Rose, 1960, 1961 а, б; Роуз и Помра — Rose a. Pomerat, 1960; Н. Н. Кочетов и др., 1962) и в электронном микроскопе (Миинфи и Ивенс — Menefee a. Evans, 1960; Эрвайин и Мюир — Irvine a. Muir, 1963; Флаксман и Барнет — Flaxman a. Barnett, 1964; Тома и др. — Thomas et al., 1964). Несмотря на это, в настоящее время изучение цитологии тканевых культур нельзя считать законченным даже при помощи светового микроскопа.

В своей работе мы пытались светомикроскопически идентифицировать органоиды и изучить их распределение в клетке, а также их отношение к витальным красителям в цитоплазме фибробластов, растущих в первичных однослойных культурах.

Материал и методика

Были изучены культуры эмбриональной «кожно-мышечной ткани» курицы (28 серий), крысы (6 серий), человека (5 серий), морской свинки (2 серии) и овцы (2 серии), растущие на покровных стеклах (рис. 1). Методика, которая применялась при культивировании, опубликована раньше (Ю. Кярнер, 1963). В качестве фиксаторов использовали смеси Карнуа, Бэкера, Рего, Шампи и Максимова. Обзорные препараты окрашивали гематоксилином Гейденгайна, а также тионином. Митохондрии выявляли окрашиванием по Альтманн-Куль и Новелли (Novelli, 1962), и импрегнировали по Фуджий (Fujii, 1956). Аппарат Гольджи осмировали по Насонову и по методу Колачева в модификации Огава (1960). Для обнаружения полисахаридов пользовались деакцией ШИК, липиды окрашивались суданом черным Б в пропиленгликоле, фосфолипиды по Бэкеру. Активность кислой фосфатазы определяли методом Гомори в модификации Гольта (Holt, 1959).

Наблюдения над живыми клетками производили посредством фазово-контрастной микроскопии, а также после витального окрашивания нейтральным красным и акридином оранжевым. Нейтральный красный применяли в 0,005%-ном растворе, акридин оранжевый в концентрации 1:10 000. Окраска производилась нейтральным красным в растворе Эрла без бикарбоната, акридином оранжевым в питательной среде.

Результаты исследования

Главное внимание было уделено цитоплазме фибробластов. Несмотря на некоторые видоспецифические различия, общая организация фибробластов у всех изученных видов та же самая, что допускает суммарное изложение наших данных. Выяснилось заметное варьирование детальной организации клеток в культуре, которое, по-видимому, обусловлено степенью дифференцировки и стадией цикла их жизни. Все же можно изложить общую картину, свойственную большинству фибробластов на данном периоде развития культуры. В развитии культуры мы различали следующие фазы: 1) латентная фаза; 2) фаза роста; 3) фаза дифференцировки и 4) фаза старения и дегенерации.

У большинства фибробластов в культуре цитоплазма разделена на эндо- и эктоплазму. Первая характеризуется большим количеством органоидов и включений, а также базофилией. Соотношение эндо- и эктоплазмы в разных фазах развития культуры варьирует.

Представляет собой интерес околядерная зона (центроплазма), которая лишена базофильности и богата гранулами и окружающими ее нитчатыми митохондриями (Ю. Кярнер, 1963).

Такая организация центроплазмы хорошо видна в микроскопе фазового контраста (рис. 2), также выявляется окрашиванием гематоксилином Гейденгайна (рис. 3) и серебрением хондриома по Фуджий (рис. 4). Но не все эти гранулы окрашиваются специфическими для митохондрий фуксином Альтманн-Кулль.

Мы сделали попытку выяснить, не является ли часть этих гранул лизосомами. Суммируя литературные данные (де Дюв — de Duve, 1959, 1960; де Дюв, 1962 а, б; Новиков — Novikoff, 1960, 1961, 1962; Кэниг — Koenig, 1962, 1964 и др.), критериями лизосом считают следующие признаки: во-первых, из них локализованы кислые гидролазы, во-вторых, их окружает одноконтурная фосфолипидная мембрана или они связаны с фосфолипидами иным образом, в-третьих, они связаны со слюнорезистентным ШИК-положительным материалом.

Нам удалось обнаружить в цитоплазме фибробластов гранулы, содержащие кислую фосфатазу. По форме и величине совокупность этих гранул очень гетерогенна. Условно можно разделить их в общих чертах на две группы (рис. 5): более мелкие (с размерами менее 0.5μ) округлые или продолговатые, и более крупные ($0.8—1.5 \mu$) с неправильной формой. Часто можно наблюдать и гранулы со всеми промежуточными размерами. Мелкие гранулы ориентированы линейно или скоплениями в форме круга, причем большая часть их расположена в центроплазме. Часто они образуют длинные нити или связываются в непрерывную сеть (рис. 6), которая в старых культурах особенно крупная. Скопления в форме круга распределяются как в центроплазме, так и более периферийно (рис. 7). Крупные гранулы распределяются в клетке или более диффузно, или скопляются также в центроплазме (рис. 8), или же в форме круга окружают центроплазму и ядро (рис. 9). В последнем

На всех рисунках фибробласты в однослойных культурах. Условные обозначения: ядро — я; центроплазма — ц; митохондрии — м; липидные гранулы — л.

Рис. 1. Культура эмбриональной «кожно-мышечной ткани» человека через три дня после посева. Микроскоп фазового контраста. Об. 10, ок. 10.

Рис. 2. Живой фибробласт человека на второй день после посева. Множество гранул вокруг центроплазмы. Микроскоп фазового контраста. Об. 70, ок. 10.

Рис. 3. Структура цитоплазмы куриного фибробласта. Максимов. Гематоксин Гейденгайна. Об. 90, ок. 10.

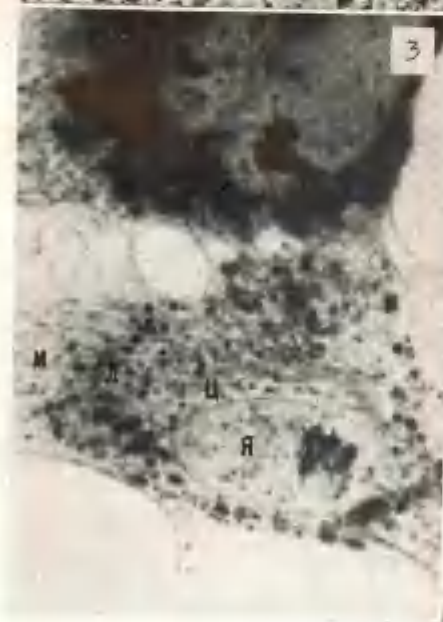
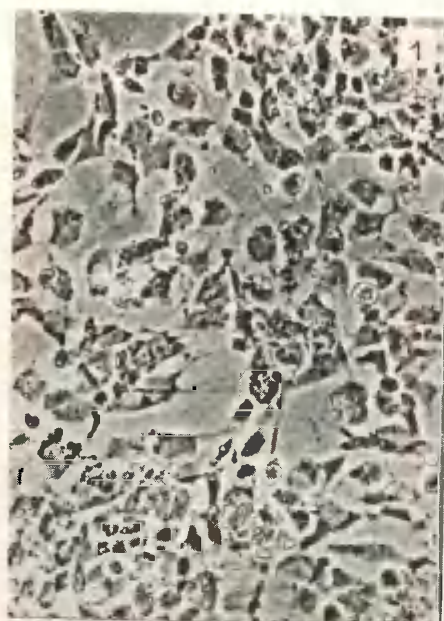
Рис. 4. Хондриом, серебрённый по Фуджий. Крыса. Об. 90, ок. 10.

Рис. 5. Мелкие и крупные гранулы с активностью кислой фосфатазы. Крупные гранулы в эктоплазме. Курица. Метод Гомори в модификации Гольт. Подкрашено эозином. Об. 90, ок. 10.

Рис. 6. Сеточка с активностью кислой фосфатазы в центроплазме. Морская свинка. Обработка и увеличение как на рис. 5.

Рис. 7. Скопление мелких гранул в форме круга в центроплазме и на периферии клетки. Морская свинка. Обработка и увеличение как на рис. 5.

Рис. 8. Крупные гранулы с активностью кислой фосфатазы в центроплазме. Курица. Метод Гомори в модификации Гольт. Подкрашено гематоксилином Делафилда. Об. 90, ок. 10.





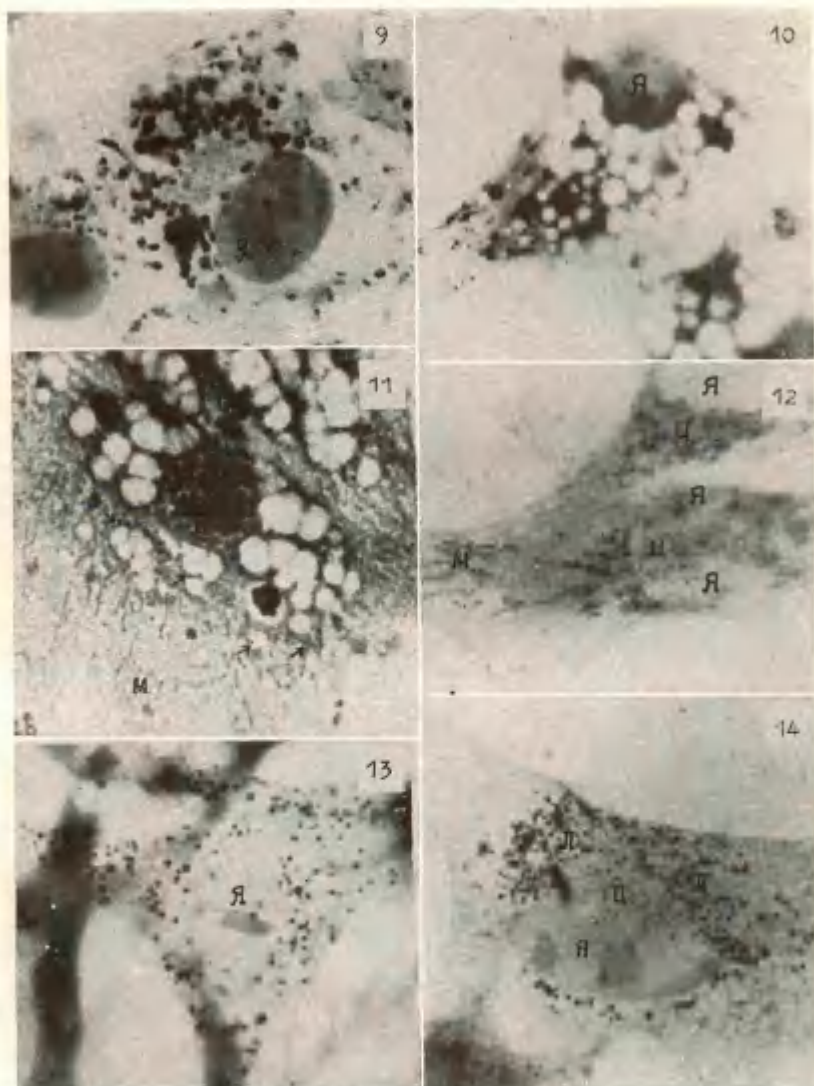


Рис. 9. Крупные гранулы с активностью кислой фосфатазы окружают центроплазму и ядро. Крыса. Обработка и увеличение как на рис. 8.

Рис. 10. Увеличение размеров крупных гранул с активностью кислой фосфатазы при дегенерации клетки. Курица. Обработка и увеличение как на рис. 8.

Рис. 11. Митохондрии, окрашенные по Новелли. Стрелка указывает на мелкие гранулы, окрашенные метилсиним. Об. 90, ок. 10.

Рис. 12. Распределение в клетке фосфолипидов, выявленных по Бэкеру. Сеточка и гранулы в центроплазме. Курица. Об. 90, ок. 10.

Рис. 13. Слюнорезистентные ШИК-положительные гранулы в центроплазме. Курица. Максимум. ШИК. Об. 90, ок. 10.

Рис. 14. Метахроматические с тионином гранулы, подвергнутые сульфатированию в концентрированной H_2SO_4 . Курица. Об. 90, ок. 10.

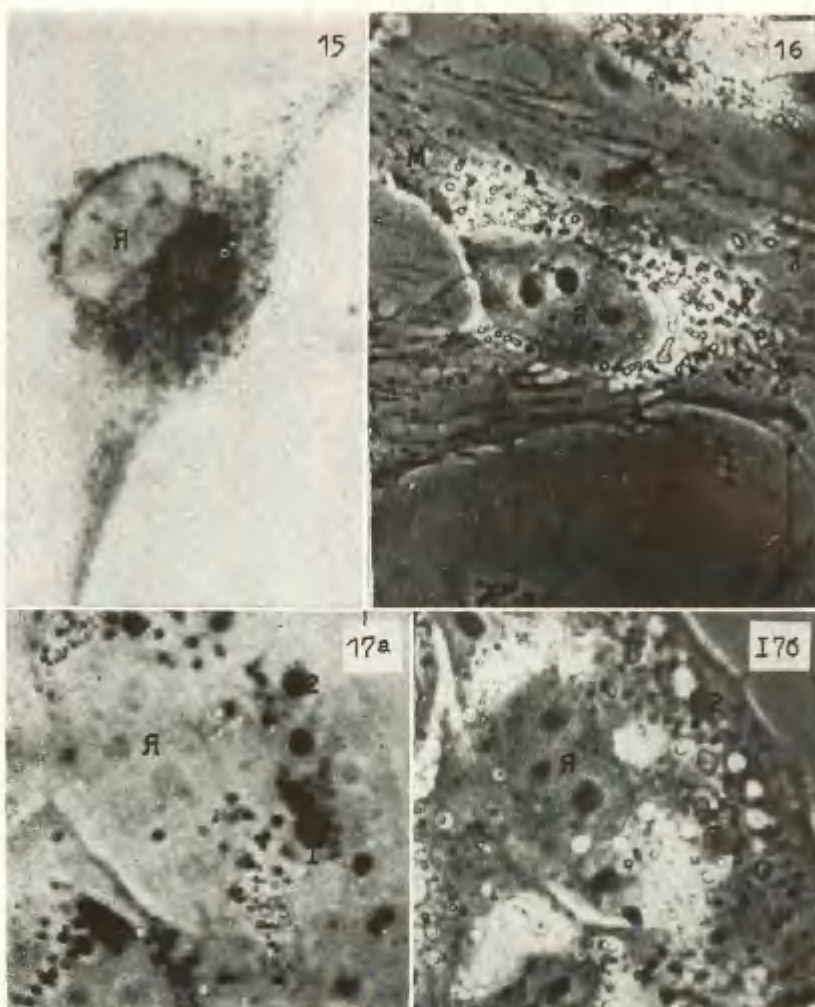


Рис. 15. Результат осмирования на аппарат Гольджи. Человек. Метод Колачева в модификации Огава. Об. 90, ок. 10.

Рис. 16. Живой фибробласт. Тельце (Т) с неравномерными контурами в центроплазме. Человек. Микроскоп фазового контраста. Об. 70, ок. 10.

Рис. 17. Судьба вакуолей нейтрального красного в чистом растворе Эрля, после предварительного 30-минутного окрашивания. Длительность опыта 22 минуты. Снимки, кроме а и д, сняты при помощи фазового контраста. Об. 70, ок. 10.

а. Вакуоли нейтрального красного после прижизненного окрашивания.

б. В микроскопе фазового контраста вакуоль 1 не обнаруживается, она окружена фазотемными гранулами. На месте вакуоли 2 обнаруживается фазотемная гранула.

случае подобные круги из липидных и фуксинофильных гранул обнаруживаются и другими методами.

По мере развития культуры активность кислой фосфатазы повышается. В фазе дифференцировки наблюдается особенно много гранул с активностью кислой фосфатазы. В фазе дегенерации повышаются также размеры гранул, достигая 3μ . Наряду с этим отмечается сильное ожирение клеток (рис. 10).

Теперь рассмотрим результаты применения еще некоторых цитологических и цитохимических методик, которые в литературе применялись для идентификации лизосом. По Новелли (1962) лизосомы окрашиваются метилсиним. И действительно, окрашивая по Новелли, мы наблюдали наряду с нитчатыми митохондриями много синих гранул (рис. 11), распределение которых было сходно с мелкими гранулами кислой фосфатазы.

В клетках, окрашенных на фосфолипиды по Бэкеру, также наблюдались гранулы (рис. 12), локализация которых совпадает с активностью фосфатазы. В отличие от распределения кислой фосфатазы, нам не пришлось встречаться с преимущественным скоплением в центроплазме слюнорезистентного ШИК-положительного материала (рис. 13). Но можно предполагать, что часть его связана с кислой фосфатазой. Более идентично было распределение активности кислой фосфатазы и гранул, дающих с тионином метакромазию, вызванную сульфатированием с концентрированным H_2SO_4 (рис. 14).

При осмировании аппарата Гольджи по Насонову, в центроплазме осмируется сеточка (рис. 15), контуры которой повторяют рисунок, наблюдаемый при демонстрации активности кислой фосфатазы. Особенно хорошо удалось осмирование по методу Колачева в модификации Огава (1960). В пользу локализации аппарата Гольджи в центроплазме говорят еще отсутствие базофилии и присутствие сеточки фосфолипидов, выявленной по Бэкеру (рис. 12). Фазо-оптически можно следить в центроплазме за каплями Гольджи (термин Роуза, 1960; Ю. Кярнер, 1963), а иногда видеть тельце с неравномерными контурами (рис. 16).

По литературным данным локализацию аппарата Гольджи можно обнаружить также прижизненным окрашиванием (Такаги и др., 1961; Д. Н. Насонов, 1963 а).

По нашим наблюдениям (рис. 17) витальное окрашивание нейтральным красным начинается отложением вакуолей красителя вокруг центроплазмы, которые окружены темными в микроскопе фазового контраста гранулами.

Если перенести стекло с клетками в чистый раствор Эрла, вакуоль красителя становится фазо-оптически темной и вокруг нее образуется мембрана. Одновременно с образованием мембраны, гранулы вокруг вакуоли становятся еле заметными. От вакуоли красителя отпочковывается дочерняя вакуоль со свет-

лым содержимым, которая, однако, сохраняет связь с первоначальной вакуолью, содержимое которой, окрашенное нейтральным красным, сморщивается. Наконец содержимое вакуоли выбрасывается из клетки и остается пустая вакуоль, имеющая вначале неправильные контуры, но вскоре снова становящаяся круглой.

При длительном окрашивании (в течение суток) вакуоли красителя увеличиваются в объеме и заполняют всю цитоплазму (рис. 18).

В препаратах, окрашенных нейтральным красным, активность кислой фосфатазы в вакуолях красителя очень высокая. Здесь она выявляется или в виде гранул в вакуолях или гомогенным отложением свинцового сульфида в вакуоли (рис. 19).

При прижизненном окрашивании акридином оранжевым краситель связывается с частью липидных гранул (рис. 20), которые скопляются в цитоплазме во время развития культуры. Уже через несколько минут после начала опыта эти гранулы приобретают красную флуоресценцию. Ядрышки при этом, в отличие от окрашивания нейтральным красным, заметно уменьшаются и округляются. Распределение кислой фосфатазы почти не отличается от нормы. При длительном окрашивании (в течение суток) размеры гранул с красной флуоресценцией увеличиваются. Детальное изучение витального окрашивания акридином оранжевым в нашей лаборатории продолжается.

Что представляют собой т. н. липидные гранулы в клетках тканевых культур? По нашим наблюдениям они происходят из центроплазмы и в первые дни культивирования скопляются вокруг нее (рис. 2). В дальнейшем они занимают почти всю эндоплазму. Для них всех характерно окрашивание суданом черным Б (рис. 21 а, б). При этом выявляется их сложное строение: они содержат в свою очередь вакуоли и суданофильные

в. Вакуоль 1 окружается мембраной и становится фазотемной. От вакуоли 2 отпочковывается дочерняя вакуоль со светлым содержимым.

г. Содержимое вакуоли 1 выброшено из клетки, останется светлая вакуоль с неравномерными контурами.

д. Без фазового контраста в клетке отмечаются только единичные красные вакуоли.

е. Вакуоль 2 тоже выброшена из клетки.

Рис. 18. Отложения нейтрального красного при прижизненном окрашивании в течение суток. Человек. Об. 40, ок. 10.

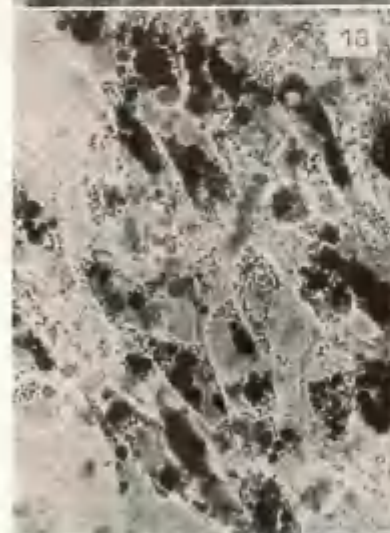
Рис. 19. Активность кислой фосфатазы после прижизненного окрашивания в течение 2 часов. Морская свинка. Метод Гомори в модификации Гольт. Подкрашено эозином. Об. 90, ок. 10.

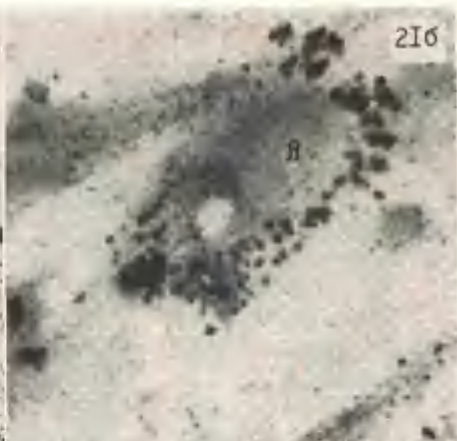
Рис. 20. Гранулы акридина оранжевого. Прижизненное окрашивание в течение 10 минут. Овца. Об. 40, ок. 10.

Рис. 21. Суданофильные гранулы в фибробластах морской свинки (а) и человека (б). Бэкер. Судан черный Б в пропиленгликоле. Об. 90, ок. 10.

Рис. 22. Гранулы фосфолипидов, выявленные по Бэкеру. Курица. Об. 90, ок. 10.

Рис. 23. Фуксинофильные гранулы. Курица. Шампи. Альтманн-Куль. Об. 90, ок. 10.





гранулы, или имеют только суданофильные мембраны. Часть из них, как отмечалось выше, обладают активностью кислой фосфатазы. Как показывают другие гистохимические реакции, они содержат слюнорезистентный ШИК-положительный материал (рис. 13), часть их состоит из фосфолипидов (рис. 22). Среди них часто можно наблюдать крупные фуксинофильные гранулы, как бы результат изменений нитчатых митохондрий (рис. 23). Кроме того, некоторые из них осmioфильны, а многие выявляются окрашиванием гематоксилином Гейденгайна (рис. 3). Из этого вытекает, что совокупность липидных гранул имеет гетерогенный состав, где отдельные гранулы варьируются как по строению, так и, может быть, по своей деятельности в клетке.

Дискуссия

Изучая детальную организацию цитоплазмы фибробластов в первичных тканевых культурах, надо подчеркнуть важную роль околоядерной зоны, т. е. центроплазмы, в жизнедеятельности клеток. Накопление разных органоидов, в том числе митохондрий в этой зоне, показывает, что центроплазма является метаболически активным центром в клетке (см. Гизе, 1959).

В центроплазме часто наблюдается также накопление гранул с активностью кислой фосфатазы. Общепринятым является положение, что демонстрированием в световом микроскопе активности кислых гидролаз, в том числе и кислой фосфатазы, можно выявить лизосомы (Гольт, 1959; Новиков, 1961; Биемпика и др. Biempica a. oth., 1962; Барка — Barka, 1962; Ворброт — Vorbrödt, 1961; де Дюв, 1964). В связи с многими предполагаемыми функциями лизосом, под последним термином в литературе понимают очень плеоморфные структуры. Наличие лизосом в тканевых культурах доказано уже раньше (Огава и др., 1961; Уаттио — Wattiaux, 1962). Учитывая литературные данные о размерах лизосом, можно считать лизосомами мелкие гранулы с активностью кислой фосфатазы. Крупные гранулы с активностью кислой фосфатазы соответствуют цитолизомам по терминологии Новикова (1960) или аутофагирующим или пищеварительным вакуолям по терминологии де Дюва (1964). Однако такое разделение только по величине не является точным и требует уточнения на основе ультраструктуры. Флаксман и Барнет (1964) различали в тканевых культурах миокарда цыпленка по ультраструктуре даже семь различных категорий гранул с активностью кислой фосфатазы.

Какие функции имеют крупные гранулы с активностью кислой фосфатазы в фибробластах? Локализация таких гранул в эктоплазме может быть связана с актом пиноцитозы. Известно, что лизосомы соединяются с фагосомами и пиносомами

(Страус — Straus, 1962, 1964 а, б; де Дюв, 1964), или пищеварительные вакуоли приобретают активность кислой фосфатазы иным способом (Дэмс — Daems, 1962). Но надо отметить, что гранулы с активностью кислой фосфатазы в амебах *Chaos chaos* имели периферическую локализацию и тогда, когда отсутствовало свидетельство о происходящем пиноцитозе (Бэрнс — Birns, 1960). С другой стороны, известно, что эндоцитозные вакуоли попадают в зону Гольджи, где и приобретают активность кислой фосфатазы (Майэ — Maeig, 1961). В связи с этим, часть крупных гранул в центроплазме или около нее являются пищеварительными вакуолями.

Цитоллизомы описаны в клетках как в патологии (Новиков, Эснер — Novikoff, Essner, 1962), так и в норме при реориентации метаболизма (Наполитано — Napolitano, 1963). По данным реферированных авторов цитоллизомы содержат часто дегенерирующие митохондрии. Можно предполагать, что в нашей работе совпадение с цитоллизомой перинуклеарных фуксинофильных гранул является свидетельством дегенерации митохондрий. Тома и соавторы (Thomas et al., 1964) описывают подобные дегенерирующие митохондрии в тканевых культурах линий ВНК $21/13$ и Н54. Весьма вероятно, что при дегенерации культуры повышение количества крупных гранул связано с аутофагирующими вакуолями. Повышение количества лизосом при дифференцировке культур может иметь такую же причину, как при дифференцировке клеток в организме (Бенкэ — Behnke, 1963).

Разную локализацию гранул с активностью кислой фосфатазы в нейронах тригеминального ганглиона Тюари и Буэн (Tewari a. Bourne, 1964) объясняют цикличностью жизнедеятельности клетки. При этом гранулы с кислой фосфатазой обнаруживаются как в местах их происхождения, так и в местах их деятельности, которые не всегда совпадают. Многие авторы предполагают, что лизосомы связаны с аппаратом Гольджи и происходят из последнего в процессе секреции (Эснер, Новиков — Essner, Novikoff, 1962; Собель — Sobel, 1962; Новиков, 1961; Новиков и др. — Novikoff a. oth., 1961; Новиков и др. — Novikoff a. oth., 1962). Этим можно объяснить преимущественную локализацию лизосом в центроплазме. Но связь между лизосомами и аппаратом Гольджи не была доказана в тканевых культурах при помощи электронного микроскопа (Флакман и Барнет, 1964).

Сеточка с активностью кислой фосфатазы совпадала с сеточкой, выявляемой осмированием на аппарат Гольджи. Отсюда вытекает, что мембраны Гольджи также активны по этому ферменту, подобно клеткам некоторых органов в составе целостного организма (Гольт и Хикс — Holt a. Hicks, 1961; Новиков и др., 1961; Кафф и Дальтон, 1962; Огава и Шинонага, 1962 б; Оси-

нак — Osinchak, 1964; Барка, 1964). Хотя аппарат Гольджи в том виде, как он выявляется импрегнированием для светового микроскопа, является искусственной структурой (Малотра — Malhotra, 1959; Оуэн — Owen, 1960), эта картина соответствует реальным структурам в живой клетке (Поликар и Бо, 1962).

Остается еще обсудить вопрос о сегрегации витальных красителей и о структурах, связанных с этой сегрегацией в клетках тканевых культур. По мнению некоторых авторов, нейтральным красным можно окрашивать преформированные структуры, например лизосомы (Огава и др., 1961; Кэниг, 1963), компоненты аппарата Гольджи (Такаги и др., 1961), цитосомы (Вент, 1961) или специальные гранулы нейтрального красного (Н. Г. Хлопин, 1940). Другие предполагают, что при окрашивании нейтральным красным происходит новообразование гранул (Тогами и Банхави — Tohamy a. Banhaway, 1960; Д. Н. Насонов, 1963 а, б; Е. М. Граменицкий, 1963). Наши наблюдения подтвердили последнее предположение. Такие различия в результатах у разных авторов могут быть объяснены различными объектами окрашивания (Д. Н. Насонов, 1963 а, б) или только разными физиологическими состояниями тканей, например при ацидозе (Мэкензи и др. — Mackenzie a. oth., 1961), или при дегенерации культур (Мануэлидес — Manuelides, 1958).

В наших опытах не было совпадения между результатами окрашивания нейтральным красным и акридином оранжевым, что соответствует предположениям Роббинса и Маркуса (Robbins a. Marcus, 1963). Эти авторы показывали, что акридин оранжевый прижизненно действительно окрашивает в клетках культуры HeLa преформированные структуры, которые по ультраструктуре являются мультивезикулярными тельцами (Роббинс и др., 1964). Эти структуры содержат кислую фосфатазу и представляют собой специализированный тип лизосом (ibid.; Осинак, 1964). Под термином мультивезикулярные тельца понимают самостоятельные органоиды во многих клетках (Policard et al. — Поликар и др., 1963), но, с другой стороны, в литературе имеются также данные, что мультивезикулярные тельца не обладают активностью кислой фосфатазы, по меньшей мере в клетках печени (Трамп и Эрикссон — Trumr a. Ericsson, 1964). По нашим наблюдениям, не все гранулы, окрашиваемые прижизненно акридином оранжевым, также не дали положительную реакцию на кислую фосфатазу, но это может быть обусловлено недостаточной чувствительностью методики.

Скопление липидных гранул в тканевых культурах связывается с жировым метаморфозом и объясняется как дегенеративный процесс (Вольман — Wolman, 1964). По данным Биззле и Гольдгабера (1955), клетки, содержащие множество липидных гранул, не всегда дегенеративные. Как мы уже видели выше, совокупность липидных гранул очень гетерогенна, а деятель-

ность их часто не связана с дегенеративными процессами. По нашему мнению, многие из липидных гранул представляют собой разновидности лизосом. Они участвуют в пищеварительных и аутофагирующих процессах, принимают участие в сегрегации вредных веществ и метаболитов, а может быть и в других функциях жизнедеятельности клеток в культуре. В связи с этим, в частности, требуется выяснение отношений цитосом, описанных Вентом (1961), с лизосомами.

По данным Фитэн Джэксона (Fitton Jackson, 1964), некоторые гранулы фибробластов в тканевых культурах обладают фиброгенетическими потенциями, а для многих гранул не наблюдается соответствующих в клетках исходных эмбриональных тканей. Это вполне понятно, так как клетки приобретают ряд других свойств в пределах свойств исходной ткани при развитии в культуре (Уилмер, 1963).

На многие вопросы, которые обсуждены выше, нельзя дать еще удовлетворительного ответа. Заключение об организации цитоплазмы клеток тканевых культур носят в известной мере предварительный характер. Требуется дальнейшее детальное изучение этой области всеми современными методами (электронный микроскоп, микрокино съемка и др.). Работы в этом плане в нашей лаборатории уже начаты.

ЛИТЕРАТУРА

- Barka T. Cellular localization of acid phosphatase activity. *J. Histochem. a. Cytochem.*, 10, 2, 231, 1962. — Barka T. Electron histochemical localization of acid phosphatase activity in intestinal epithelium. *J. Histochem. a. Cytochem.*, 12, 1, 9, 1964. — Behnke O. Demonstration of acid phosphatase containing granules and cytoplasmic bodies in the epithelium of foetal rat duodenum during certain stages of differentiation. *J. Cell Biol.*, 18, 2, 251, 1963. — Biempica L., A. B. Novikoff, B. Kahn. Biochemical cytology of absorptive cells in rat intestine. *J. Histochem. a. Cytochem.*, 10, 6, 654, 1962. — Bieseke J. J., P. A. Goldhaber A. A study of cytoplasmic lipid granularity in tissue culture cells. *Cancer Res.*, 15, 767, 1955. — Birns M. The localization of acid phosphatase activity in the ameba, *Chaos Chaos. Exptl. Cell Res.*, 20, 1, 202, 1960. — Daems W. Th. Distribution of acid phosphatase in liver tissue of dextran-injected mice as observed with the electron microscope. *Electron Microscopy*, vol. II, VV—12, 1962. — de Duve C. The function of intracellular enzymes. *Exptl. Cell Res.*, suppl. 7, 169, 1959. — de Duve C. Intracellular localization of enzymes. *Nature (Engl.)*, 187, 4740, 836, 1960. — Essner E., A. B. Novikoff. Cytological studies on two functional hepatomas. Interrelations of E. R., Golgi apparatus and lysosomes. *J. Cell Biol.*, 15, 2, 289, 1962. — Farnes P., B. Barker. Cytochemical studies of human bone marrow fibroblast — like cells. 1. Alkaline phosphatase. *Exptl. Cell Res.*, 29, 1—2, 278, 1963. — Fitton Jackson S. Connective tissue cells. *The Cell*, v. VI, 387, 1964. — Flaxman B. A., R. J. Barnett. Acid phosphatase activity in some dense bodies of cultured chick myocardial cells. *J. Histochem. a. Cytochem.*, 12, 1, 36, 1964. — Fujii I. Method for highly

selective and very clear demonstration of the mitochondria by silver impregnation. Arch. Histol. Jap., 14, 2, 303, 1956. — Henrichsen E. Alkaline phosphatase in osteoblasts and fibroblasts cultivated in vitro. Exptl. Cell Res., v. 11, 1, 115, 1956. — Holt S. J. Factors governing the validity of staining methods for enzymes, and their bearing upon the Gomori acid phosphatase technique. Exptl. Cell Res., suppl. 7, 1, 1959. — Holt S. J., R. M. Hicks. The localization of acid phosphatases in rat liver cells as revealed by combined cytochemical staining and electron microscopy. J. Biophys. a. Biochem. Cytol., 11, 1, 47, 1961. — Irvine W. J., A. R. Muir. An electron microscopic study of human thyroid cells in vitro. Exptl. Cell Res., 29, 1, 2, 73, 1963. — Koenig H. Histological distribution of brain gangliosides: lysosomes as glycolipoprotein granules. Nature, 195, 4843, 782, 1962. — Koenig H. Intravital staining of lysosomes by basic dyes and metallic ions. J. Histochem. a. Cytochem., 11, 1, 120, 1963. — Koenig H. In vivo release of acid phosphatase from lysosomes of liver cells induced by diverse agents. J. Histochem. a. Cytochem., 12, 1, 7, 1964. — Mackenzie C. Q., J. B. Mackenzie, P. Beck. The effect of pH on growth, protein synthesis and lipid-rich particles of cultured mammalian cells. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9, 1, 141, 1961. — Maeir D. M. A technique for the study of protein uptake in tissue culture. J. Exptl. Cell Res., 23, 1, 200, 1961. — Malhotra S. K. What is the "Golgi apparatus" in its classical site within the neurons of vertebrates. Quart. J. Microsc. Science, 100, 3, 339, 1959. — Manuelides E. E. Pathological swelling and vacuolization of cells. Frontiers in Cytology. Ed. by S. L. Palay, New Haven, Yale Univ. Press, 417, 1958. — Menefee M. G. a. V. J. Evans. Structural differences produced in mammalian cells by changes in their environment. J. Nat. Cancer Inst., 25, 6, 1303, 1960. — Napolitano L. Cytolysosomes in metabolically active cells. J. Cell Biol., 18, 2, 478, 1963. — Novelli A. A short method for chondriome. J. Histochem. a. Cytochem., 10, 1, 102, 1962. — Novikoff A. B. Biochemical and staining reactions of cytoplasmic constituents. Developing Cell Systems and Their Control. Ronald Press, New York, 167, 1960. — Novikoff A. B. Lysosomes and related particles. The Cell, v. II, 423, 1961. — Novikoff A. B., E. Essner. Cytolysosomes and mitochondrial degeneration. J. Cell Biol., 15, 1, 140, 1962. — Novikoff A. B., Ed. Essner, L. Biempica, Ph. Iacofano. Lysosomes and secretory granules: Electron microscopic examination of enzyme reaction product. J. Histochem. a. Cytochem., 10, 6, 654, 1962. — Novikoff A. B., S. Goldfischer, E. Essner, Ph. Iacofano. The relations between acid phosphatase-rich lysosomes and the Golgi apparatus. J. Histochem. a. Cytochem., 9, 6, 630, 1961. — Ogawa K. Cytochemistry of cultured neural tissue. II. The Golgi apparatus. J. Histochem. a. Cytochem., 8, 5, 352, 1960. — Ogawa K., N. Mizuno, M. Okamoto. Cytochemistry of cultured neural tissue. III. Heterogeneity of lysosomes. J. Histochem. a. Cytochem., 9, 6, 635, 1961. — Ogawa K., M. Okamoto. Cytochemistry of cultured neural tissue. I. Intracellular granules of astrocytes. J. Histochem. a. Cytochem., 8, 5, 351, 1960. — Ogawa K. a. Y. Shinonaga. Intramitochondrial localization of oxidative enzymes in cultured cells. J. Histochem. a. Cytochem., 10, 1, 104, 1962. — Ogawa K., Y. Shinonaga. Some notes on the origin of lysosomes studied by electron microscope. J. Histochem. a. Cytochem., 10, 6, 687, 1962. — Osinchak J. Electron microscopic localization of acid phosphatase and thiamine pyrophosphatase activity in hypothalamic neurosecretory cells of the rat. J. Cell Biol., 21, 1, 35, 1964. — Owen L. T. Electron-microscopy of the Golgi apparatus. Nature (Engl.) 185, 4714, 703, 1960. — Policard A., A. Collet, J.-C. Martin, S. Spégermain, C. Renet. Une infrastructure encore peu connue du cytoplasma, les corps multivesiculaires. Nouvelle rev. franç. hématol., 3, 4, 421, 1963. — Robbins E., P. J. Marcus. Dynamics of acridine orange-cell interaction. I. Interrelationship of acridine orange particles and cytoplasmic reddening. J. Cell Biol., 18, 2, 237, 1963. — Robbins E., P. J. Marcus, N. K. Gonnatas. Dynamics of acridine orange-cell interaction. II. Dye-induced ultrastructural changes in multivesicular bodies (Acridine Orange Particles): J. Cell

Biol., 21, 1, 49, 1964. — Rose G. G. Cinematographic studies on microkinetospheres, the Golgi complex and the endoplasmic reticulum. *Forschungsfilm*, 3, 6, 371, 1960. — Rose G. G. The Golgi complex in living osteoblasts. *J. Biophys. a. Biochem. Cytology*, 9, 463, 1961a. — Rose G. G. The Golgi complex and endoplasmic reticulum in tissue cultures Human melanoma cells with Phase contrast microscopy. *Cancer Res.*, 21, 5, 706, 1961b. — Rose G. G., C. M. Pomerat. Phase contrast observations of the endoplasmic reticulum in living tissue cultures. *J. Biophys. a. Biochem. Cytology*, 8, 2, 423, 1960. — Sobel H. J. Relationship of three lysosomal enzymes to the Golgi zone and secretory activity in the rat pituitary and thyroid glands. *The Anat. Rec.*, 143, 4, 389, 1962. — Straus W. Cytochemical investigation of phagosomes and related structures in cryostat sections of the kidney and liver of rat after intravenous administration of horseradish peroxidase. *Exptl. Cell Res.*, 27, 1, 80, 1962. — Straus W. Observations on the relationship between lysosomes and phagosomes in kidney and liver after administration of horseradish peroxidase. *J. Histochem. a. Cytochem.*, 12, 1, 9, 10, 1964. — Straus W. Cytochemical observations on the relationship between lysosomes and phagosomes in kidney and liver by combined staining for acid phosphatase and intravenously injected horseradish peroxidase. *J. Cell Biol.*, 20, 3, 467, 1964. — Takagi S., J. Kitada, H. Masuda, M. Tagawa. A comparative study of staining and histochemical reactions of the components of Golgi complex of the fibroblasts in vitro and the ascites tumor cells. *Cytologia*, 26, 3—4, 448, 1961. — Tewari H. B., G. H. Bourne. Histochemical studies on the distribution of alkaline and acid phosphatases and 5-nucleotidase in the trigeminal ganglion cells of rat. *Acta histochem.*, 17, 5/8, 197, 1964. — Thomas J.-André, J. P. Fouquet, E. Holande, M. Pouchalet, D. Vallet. Étude comparative du chondriome et du caryotype des cellules BHK 21/13 et des cellules cancéreuses H54 qui en proviennent. *C. R. Acad. Sci. Paris*, t. 258, 25, 259, 1964. — Tohamy A. Moussa, M. Banhawly. The Golgi dictyosomes during the differentiation and growth of the nerve cells of *Schistocerca gregaria* with special reference to the problem of neurosecretion. *J. Roy. Microscop. Soc.*, 79, 1, 19, 1960. — Trump B. F., J. L. E. Ericsson. Electron microscopic observations on the location of acid phosphatase in mouse hepatic parenchymal cells. *Exptl. Cell Res.*, 33, 3, 598, 1964. — Vorbrodt A. Histochemical studies on the intracellular localization of acid deoxyribonuclease. *J. Histochem. a. Cytochem.*, 9, 6, 647, 1961. — Wattiaux R. Localisation des hydrolases acides dans les cellules HeLa. *Archives internationales de Physiologie et de Biochimie*, vol. LXX, 5, 1962. — Wendt E. Die Wirkung von Röntgenstrahlen auf das Zentroplasma und die Cytosomen von Gewebekulturzellen. *Z. Zellforsch.*, 53, 172, 1961. — Wolman E. M. Fatty metamorphosis studied in tissue culture and unicellular organisms. In *Hdb. d. Histochemie*, hrsg. v. W. Graumann u. K. Neumann, Bd. V/2, Lipides. Histochemistry of lipids in pathology. Fischer, Stuttgart, 21, 1964. — де Дюв Ш. Лизосомы — новый тип цитоплазматических частиц. В кн. Структурные компоненты клетки. Изд. ИЛ, Москва, 128, 1962a. — де Дюв К. Идентификация и характеристика особых цитоплазматических частиц печени крысы. Функциональная биохимия клеточных структур. Изд. АН СССР, Москва, 171, 1962b. — де Дюв К. Лизосома. В сб.: «Структура и функции клетки». Изд. «Мир», М., 90, 1964. — Гизе А. Физиология клетки. М., 1959. — Граменицкий Е. М. Прижизненная окраска клеток и тканей в норме и патологии. Гос. изд. мед. литер., Л., 1963. — Левина Д. М., Б. В. Жив. Морфологический и цитохимический анализ первичной культуры кожно-мышечной ткани мышечных эмбрионов. Сб. «Материалы Всесоюз. конф. по вопр. вет. вирусол.», М., 68, 1964. — Залкинд С. Я. Динамика цитологических изменений, культивируемых вне организма клеток в норме и патологии. Вопросы цитологии, гистологии и эмбриологии. Изд. АН Латв. ССР, Рига, 15, 1960. — Залкинд С. Я., В. Г. Заславский. Проблема адаптации клеток к условиям культивирования вне организма. Цитология, IV, 5, 519, 1962. — Залкинд С. Я., Л. Г. Степанова. Сравнительно-цитологиче-

ский анализ клеток культуры тканей в норме и при воздействии вируса полиомиелита. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 50, 1, 76, 1960. — Заславский В. Г. Цитологическое и цитохимическое изучение культуры почечных клеток обезьян. *Acta virologica*, 4, 2, 124, 1960. — Заславский В. Г. Сравнительное цитологическое изучение активности сукциндегидразы и щелочной фосфатазы в клетках первично-эксплантированных и перевиваемых тканевых культур. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 51, 2, 107, 1961. — Заславский В. Г. и А. М. Амченкова. Цитохимическое изучение активности сукциндегидразы в культивируемых вне организма клетках. Бюлл. эксперим. биол. и мед., 51, 1, 91, 1961. — Каффе Э., А. Дальтон. Биохимическое изучение изолированных мембран аппарата Гольджи. В кн.: Структурные компоненты клетки. Изд. ИЛ, Москва, 117, 1962. — Кочетов Н. Н., О. С. Гудима, В. Н. Милютин. Прижизненные наблюдения и микроиносъемка развития клеток в культурах тканей. Докл. АН СССР, т. 144, 2, 441, 1962. — Кярнер Ю. О светомикроскопической организации цитоплазмы фибробластов, растущих в однослойных тканевых культурах. Уч. записки ТГУ, Труды по медицине, VIII, 320, 1963. — Насонов Д. Н. Физиологическое значение аппарата Гольджи в свете метода витальной окраски. В сб.: Некоторые вопросы морфологии и физиологии клетки. Изд. АН СССР, М.—Л., 130, 1963. — Насонов Д. Н. О влиянии окислительных процессов на распределение витальных красителей в клетке. Там же, 173, 1963. — Поликар А., Ш. А. Бо. Субмикроскопические структуры клеток и тканей в норме и патологии. Гос. изд. мед. литер., «Медгиз», Л. отд., 1962. — Пыльдвере К. И. О росте и превращении так называемой «кожно-мышечной ткани» в однослойной трипсинизированной культуре. Арх. анат., гист. и эмбр., т. XLV, 10, 20, 1963а. — Пыльдвере К. О некоторых проблемах тканевой биологии в однослойных культурах. Уч. записки ТГУ, Труды по медицине V, 218, 1963б. — Хлоппин Н. Г. Культура тканей. Медгиз 1940. — Уилмер Э. Ткани в культуре и in situ. В сб.: Моделирование в биологии. Изд. ИЛ, М., 65 1963. —

CYTOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE FIBROBLASTS OF MONOLAYER PRIMARY CULTURES

J. Kärner

S u m m a r y

The organization of the cytoplasm of the fibroblasts growing in the monolayer primary cultures of the embryonic "skin-muscle tissue" of different animal species were studied before and after vitally staining by means of cytological and cytochemical techniques for light microscope. The number of intracellular granules with acid phosphatase activity increase in the phase of differentiation and in aging. These granules, called lipid ones, are sudanophile, contain fosfolipids (Baker's test) and part of them saliva-resistant PAS-positive material. As concluded, these granules are lysosomes or related structures. They stain vitally with acridine orange (1 : 10000). In vitally staining with neutral red appear the newly formed red granules in the centroplasm. These granules have also the activity of acid phosphatase. After these structures have activity of acid phosphatase an osmiophile net, revealed by techniques for apparatus Golgi. The origin and function of lysosomes in tissue culture cells are discussed in detail.

О ЛИМФОЦИТОПОЭЗЕ И РЕЦИРКУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ В ТИМУСЕ ЦЫПЛЯТ

Ю. П. Хуссар

Лаборатория экспериментальной гистологии Института экспериментальной гистологии АМН СССР и Центральная научно-исследовательская лаборатория Тартуского государственного университета

В последние 4—5 лет появилось большое количество исследований, подтверждающих центральную роль тимуса как органа иммуногенеза, в частности трансплантационного иммунитета (Миллер — Miller, 1961; Арнасон и соавт. — Arnason et al., 1962; Дамешек — Dameshek, 1962; Шэман и соавт. — Sherman et al., 1962; Мартинес и соавт. — Martinez et al., 1962; Азар и соавт. — Azar et al., 1963; Исакович и соавт. — Isakovic et al., 1963; Сценберг и Уорнер — Szenberg a. Warner, 1963; А. Я. Фриденштейн, 1964 и мн. др.). Это делает крайне необходимым дальнейшее изучение некоторых спорных вопросов биологии лимфоидной ткани тимуса, вместе с тем и уточнение механизмов иммунизаторных процессов. Согласно клеточной теории иммунитета, иммунологическую компетентность приобретают лимфоциты или путем репопуляции тимуса, «обучения» (Глоберсон и соавт. — Globerson et al., 1962 и др.), или путем выселения иммунологически компетентных клеток (лимфоцитов) из тимуса в другие лимфоидные органы (Миллер, 1961; Бэннет — Burnet, 1962 и др.). В связи с этим встает вопрос и о лимфоцитопоезе в тимусе (Киндред — Kindred, 1940; 1942; 1955; Андреасен и Оттесен — Andreassen a. Ottesen, 1945; Йоффе — Yoffey, 1955; Троуэлл — Trowell, 1957; Сент-Мари — Sainte-Marie, 1959; Леблон и Сент-Мари — Leblon a. Sainte-Marie, 1960 и др.), а также по ритмике его, данные по которой немногочисленны и противоречивы (Дроглевер Фортуйн — Ван-Лейден — Droogleever Fortyn — van-Leyden, 1924; И. А. Алов, 1959). Многие иммунологи обсуждают вопрос о гетерогенности лимфоидной популяции и в целом ставят под сомнение классическое представление о морфогенезе лимфоцитов.

Задачей настоящей работы является изучение митотической

активности лимфоцитов и суточной их рециркуляции в различных участках долек тимуса цыплят, а также сравнительная характеристика морфологии лимфоцитов коркового и мозгового вещества его долек.

Опыты были поставлены на 27 3-недельных цыплятах, которые забивались по три в каждые три часа в течение одних суток. Опыты проводились в начале апреля 1963 года. Материал обрабатывался общегистологическими методами: парафиновые срезы толщиной 7 мк окрашивались гематоксилином и эозином, азур II-эозином, железным гематоксилином по Гейденгайну. Подсчет митозов производился на препаратах, окрашенных по Фельгену. Подсчитывалось количество митозов на 6000 клеток и вычислялся митотический коэффициент (МК — количество митозов на 1000 клеток). Подсчет производился по отдельным фазам митоза.

Морфологию лимфоцитов и их количество изучали на препаратах, окрашенных азур II-эозином. Из современных представлений гематологии (И. А. Кассирский и Г. А. Алексеев, 1962 и др.) хорошо известно, что одни лишь размеры лимфоцитов не могут характеризовать их возраст. Так, например, лимфобласты большей частью являются крупными клетками, поэтому возник неправильный термин «большой лимфоцит» для обозначения молодости клетки. На самом деле «большие лимфоциты» могут быть не только молодыми, но и старыми, дошедшими до предела возраста. Поэтому для более точного и правильного представления о морфологии лимфоцитов мы пользовались при их подсчете схемой Арнета, учитывающей кроме размеров лимфоцитов ядерно-цитоплазматическое соотношение и строение ядра, в частности ядерной мембраны. Согласно этой схеме, все лимфоциты условно разделялись на большие, средние и малые широкоцитоплазматические (ободок цитоплазмы вокруг ядра хорошо заметен) и узкоцитоплазматические (цитоплазма лимфоцитов в световом микроскопе не заметна) *. Подсчет лимфоцитов производился микроскопом МБИ-1 при об. $90\times$, ок. $7\times$ с поставленной в нем квадратной диафрагмой 8×8 мм (соответствующей $12\,800\text{ мк}^2$ площади препарата). Измерение же диаметра ядер лимфоцитов при этом производилось линейным окулярным микрометром. В таких условиях измерения целесообразным оказалось условное разделение ядер по диаметру на следующие группы: 1) диаметр ядра равен 2—3 делениям окулярного микрометра — малые лимфоциты, 2) диаметр ядра равен 3—4 делениям — средние и 3) диаметр ядра выше 4 деления — большие лимфоциты. В абсолютных цифрах получается соответ-

* Название «лимфоциты голого ядра» для клеток этой группы, по-видимому, не удачно, т. к. при электронно-микроскопическом исследовании узкий ободок цитоплазмы вокруг таких ядер, по крайней мере у части из них, виден.

ственно 2,8—4,2, 4,2—5,6 и выше 5,6 мк. Это хорошо совпадает с общепринятым разделением лимфоцитов на большие, средние и малые (см. Н. Г. Хлопин, 1960; В. Н. Никитин, 1956 и др.). При подсчете клеток отмечались и пикнозы.

Все цифровые данные подвергались вариационно-статистической обработке по Фишеру и Вебер.

Результаты опытов

При анализе полученных результатов выяснилось, что в долях тимуса количество лимфоцитов и их митозов в разные часы разное (рис. 1, 2). Наибольший подъем количества лимфоцитов наблюдается в 9—12 часов, в зависимости от их генерации. Как видно из сопоставления рис. 1а и 1б, четкое увеличение числа лимфоцитов в корковом веществе тимуса происходит в 9 часов. В мозговом веществе изменения без количественного учета не устанавливаются. При большем увеличении видно, что лимфоциты заполняют корковое вещество неравномерно (очаговый характер распределения) (рис. 1в) и только в 9—12 часов, т. е. в то время, когда количество их достигает максимума, они равномерно заселяют орган (рис. 1г). Любопытно, что именно такая картина строения долек тимуса обычно представлена в учебниках и руководствах.

Изменения митотической активности в исследуемые сроки (6 и 9 часов) обратны в отношении изменений количества лимфоцитов. На рис. 2 хорошо видно, что в 6 часов митозов больше, а самих лимфоцитов меньше, чем в 9 часов. В мозговом веществе изменения эти менее выражены.

Цифровой материал подсчета лимфоцитов и их митозов представлен в двух таблицах. На первой из них (табл. 1) де-

Таблица 1

Количество митозов больших, средних и малых лимфоцитов на 6000 клеток по фазам и МК в корковом веществе долек тимуса цыплят (среднесуточные данные).

	Профазы	Мета- фазы	Анафазы	Тело- фазы	Всего	МК
Большие лимфоциты	4,9	2,4	1,4	1,0	9,7	—
Средние лимфоциты	4,1	2,8	1,9	1,1	9,9	—
Малые лимфоциты	0,7	0,5	0,6	0,4	2,1	—
Всего митозов на 6000 клеток:					21,7	3,6 ± 0,4

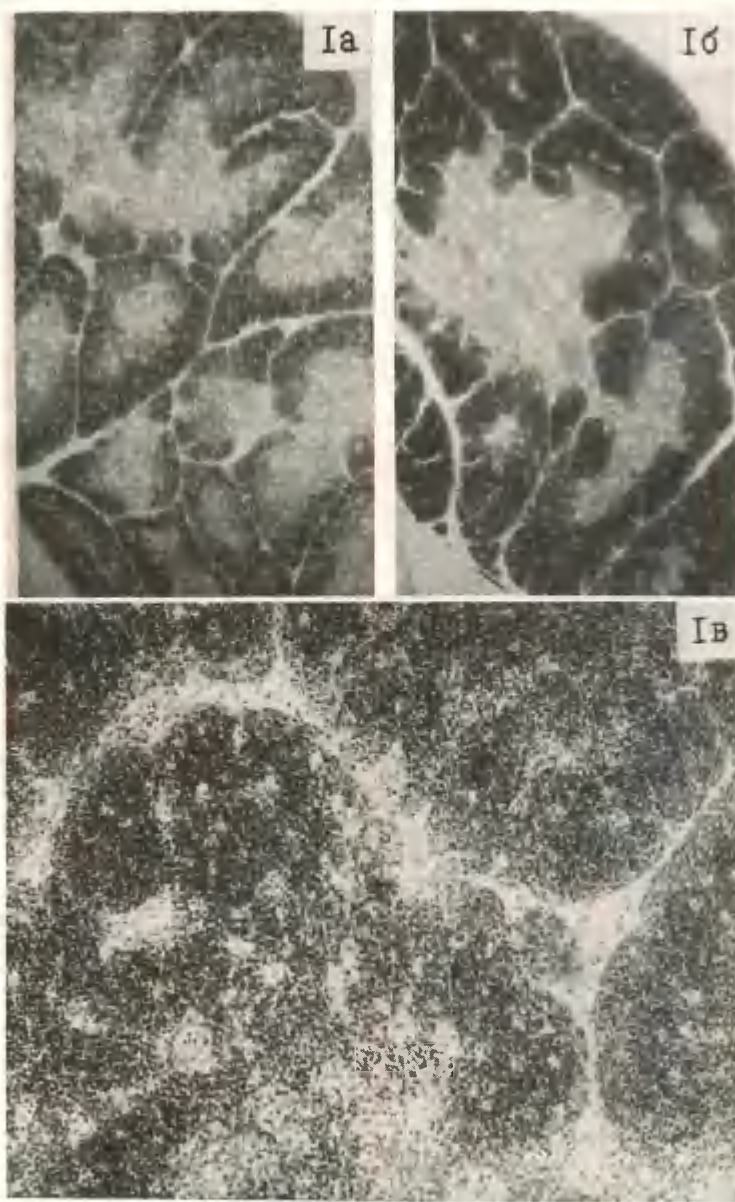


Рис. 1. Тимус 3-недельного цыпленка: а, б — в 6 часов, в, г — в 9 часов.
Количество лимфоцитов в 9 часов значительно больше, чем в 6 часов.

Окраска: гематоксилин и эозин. Увел.: а, б — 28х, в, г — 140х

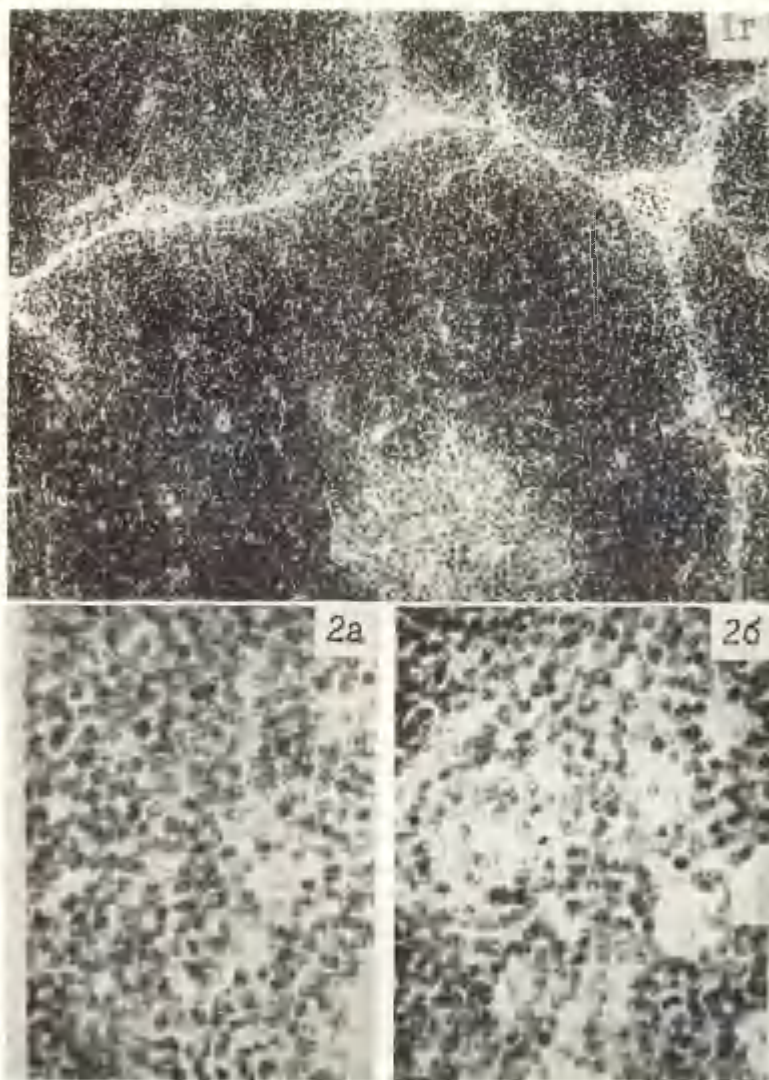


Рис. 2 Тимус 3-недельного цыпленка: а — в 6 часов, б — в 9 часов.
Обратная зависимость между количеством лимфоцитов и их митозов.
Окраска: по Фельгену. Увел.: 280х

монстрируются средние суточные данные митотической активности лимфоцитов коркового вещества долек тимуса.* Из таблицы видно, что количество митотически делящихся лимфоцитов коркового вещества тимуса цыпят высокое ($MK = 3,6 \pm 0,4$) и что фазовое соотношение (отношение первых двух фаз к следующим двум) для определенной генерации лимфоцитов (большие, средние или малые) при этом постоянная величина (рис. 3).

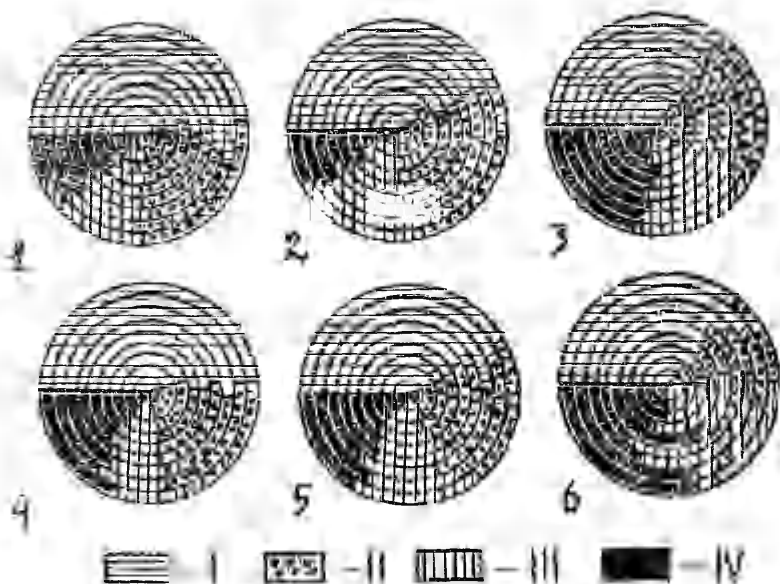


Рис. 3. Продолжительность фаз митоза лимфоцитов в тимусе цыпленка. 1, 2, 3 — корковое вещество, 4, 5, 6 — мозговое вещество. 1, 4 — большие, 2, 5 — средние и 3, 6 — малые лимфоциты. I — профаза, II — метафаза, III — анафаза и IV — телофаза. Концентрические круги демонстрируют результаты исследования через каждые 3 часа в течение суток (наружный круг при этом соответствует результатам, полученным при взятии материала в 24 часа, и т. д.).

Видно, что фазовые соотношения не подвергаются суточным колебаниям. Более того, для отдельных генераций лимфоцитов они более или менее постоянные величины.

Для макрогенераций лимфоцитов оно около 3-х, для микрогенераций — около единицы. Для мозгового вещества получены несколько меньшие цифры. Это объясняется, по-видимому, тем,

* Данные по суточному ритму митозов лимфоцитов оказались несколько неожиданными: они будут сообщены в следующей работе авторов вместе с результатами дополнительных серий опытов.

что некоторые лимфоциты переходят из коркового вещества в мозговое на стадии незаконченного митоза. Все это отражает, вероятно, более глубокие цитогенетические закономерности прохождения митотического цикла клетками разной степени дифференцировки. Это положение общей цитологии (Робертис и соавт., 1960 и др.) осталось совершенно не затронутым в монографии И. А. Алова (1964) при объяснении причин изменения фазовых соотношений митоза.

Следующая таблица (табл. II) демонстрирует суточный ритм лимфоцитов тимуса. Как видно из этой таблицы, максимальный подъем больших и средних лимфоцитов осуществляется

Таблица II

Количество лимфоцитов на единицу площади (12 800 мк²) в различных участках долек тимуса цыпят в разные часы

Часы	Количество цыплят	Корковое вещество				Мозговое вещество			
		большие лимфоциты	средние лимфоциты	малые лимфоц.	Всего	большие лимфоц.	средние лимфоц.	малые лимфоц.	Всего
0	3	21 ± 3	17 ± 2	284 ± 11	322 ± 12	5 ± 1	5 ± 1	142 ± 6	150 ± 6
3	3	25 ± 3	18 ± 2	297 ± 12	340 ± 13	6 ± 1	4 ± 1	152 ± 7	162 ± 7
6	3*	48 ± 5	21 ± 3	302 ± 12	371 ± 14	10 ± 1	7 ± 1	143 ± 6	160 ± 7
9	3	68 ± 6	35 ± 4	379 ± 15	482 ± 18	12 ± 2	10 ± 1	170 ± 7	192 ± 8
12	3	20 ± 3	18 ± 2	414 ± 16	453 ± 17	5 ± 1	4 ± 1	164 ± 7	173 ± 7
15	3	31 ± 3	16 ± 2	305 ± 12	352 ± 14	6 ± 1	6 ± 1	150 ± 6	162 ± 6
18	3	22 ± 3	18 ± 2	301 ± 12	341 ± 14	7 ± 1	6 ± 1	148 ± 6	161 ± 7
21	3	18 ± 2	15 ± 1	277 ± 10	310 ± 11	4 ± 1	5 ± 1	144 ± 5	153 ± 3
24	3	23 ± 2	19 ± 2	290 ± 12	332 ± 12	6 ± 1	5 ± 1	130 ± 5	143 ± 5
Среднее:		31 ± 3	20 ± 2	316 ± 12	367 ± 12	7 ± 1	6 ± 1	149 ± 5	162 ± 7

* В этой группе гистологический анализ производился только у 2 цыплят (материал одного цыпленка был испорчен при обработке).

в 9, а малых — в 12 часов, т. е. неодновременно. В то же время бросается в глаза, что резкий подъем больших лимфоцитов наблюдается еще раньше — в 6 часов. Учитывая то обстоятельство, что изменения митотической активности разных лимфоцитов в течение суток синхронные (одновременные), мы должны допустить, что представленные данные демонстрируют последовательные стадии дифференцировки разных генераций изогенной лимфоидной популяции. Вопрос об изогенности лимфоидной популяции в целом довольно запутан. В одной из обзоров

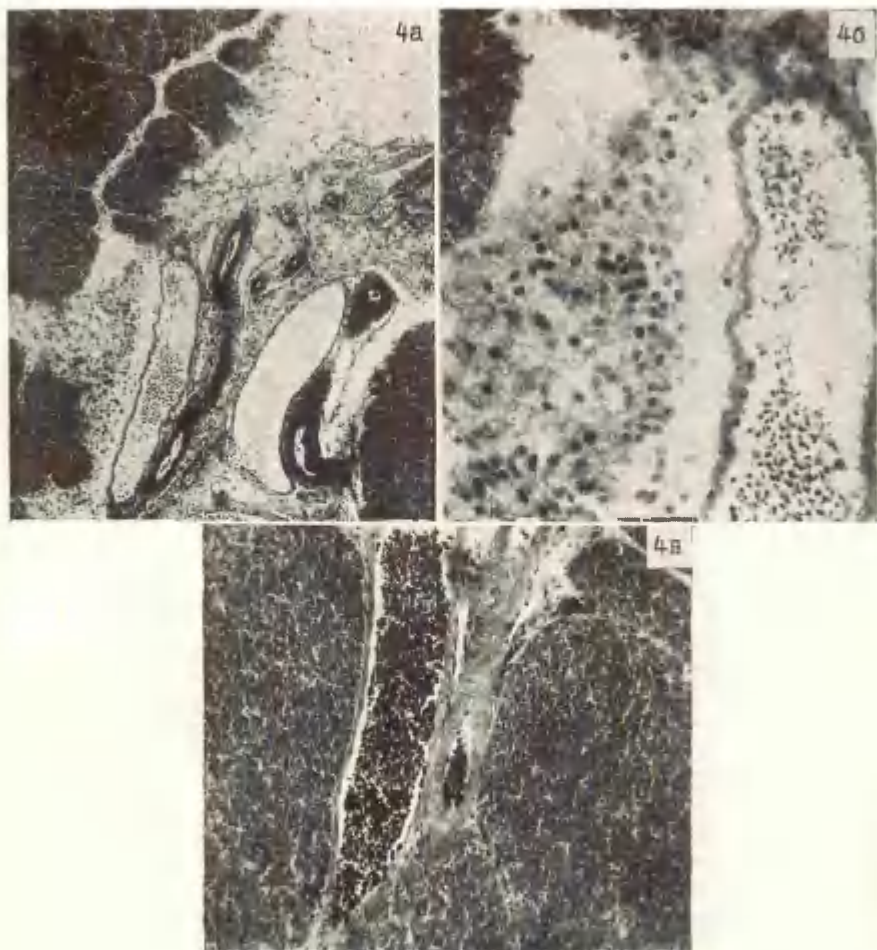


Рис. 4. Тимус 3-недельного цыпленка: а, б — в 6 часов, в — в 9 часов. Выселения лимфоцитов в ткань тимуса, наблюдаемого в 6 часов, не происходит в 9 часов. Окраска: железным гематоксилином по Гейденгайну. Увел.: а, в — 180 х, б — 360 х

статей Е. А. Лурия и А. Я. Фриденштейн (1964) указывают, что классические представления о трансформации ретикулярных клеток через стадии большого и среднего лимфоцита в малый требуют пересмотра. Почти в то же время вышла работа А. Я. Фриденштейна (1964), где указывается на возможность превращения ретикулярных клеток в лимфоидные и на то, что «до сих пор система А. А. Максимова — А. А. Заварзина с успехом выдерживает испытание».

Сопоставление количества лимфоцитов с митотической их активностью показывает, что, например, увеличение количества лимфоцитов в 9 часов значительно больше, чем это обеспечивается данным уровнем митотической активности. При этом уровень подъема больших и средних лимфоцитов более или менее соответствует митотической их активности, уровень же подъема количества малых лимфоцитов наполовину выше. Значит, избыточные лимфоциты, главным образом малые, не могут быть результатом лимфопозза в тимусе, и они, следовательно, являются пришлыми. Для более точных расчетов, однако, нами предусмотрена специальная серия опытов на продолжительность митозов разных генераций лимфоцитов.

Эти данные интересно сопоставить с изменениями сосудистой реакции (рис. 4). Как видно из рисунка, в 6 часов наблюдается отчетливая картина миграции лимфоцитов через стенку вены в ткань тимуса (рис. 4а, б), затем, уже в 9 часов, хотя сосуды и переполнены кровью, миграции лимфоцитов через стенку не происходит (рис. 4в).

В дневные часы, после 12, количество лимфоцитов резко падает. При наличии постоянного уровня митотической активности и количества клеток с пикнозами (в корковом веществе около 0,5, в мозговом — 1%) это может быть достигнуто только путем выселения лимфоцитов из органа. На это указывает и вновь появляющаяся картина миграции лимфоцитов через стенку сосуда.

Таким образом, картина заселения тимуса лимфоцитами из других органов и выселения их из органа осуществляется ритмично и демонстрирует рециркуляцию лимфоцитов тимуса.

Наконец, результаты подсчета лимфоцитов по схеме Арнета показали, что широкоцитоплазматические лимфоциты по строению их ядер являются большей частью более молодыми генерациями лимфоцитов, по сравнению с узкоцитоплазматическими, и на основе всех предусмотренных в этой схеме критериев все лимфоциты можно разделить на «юные» и «старые» (рис. 5). Как видно из рисунка, для всех генераций лимфоцитов результаты одни и те же — в корковом веществе преобладают «юные», в мозговом — более «старые» формы лимфоцитов. Этим, по-видимому, и объясняется резкое различие в свойствах (в част-

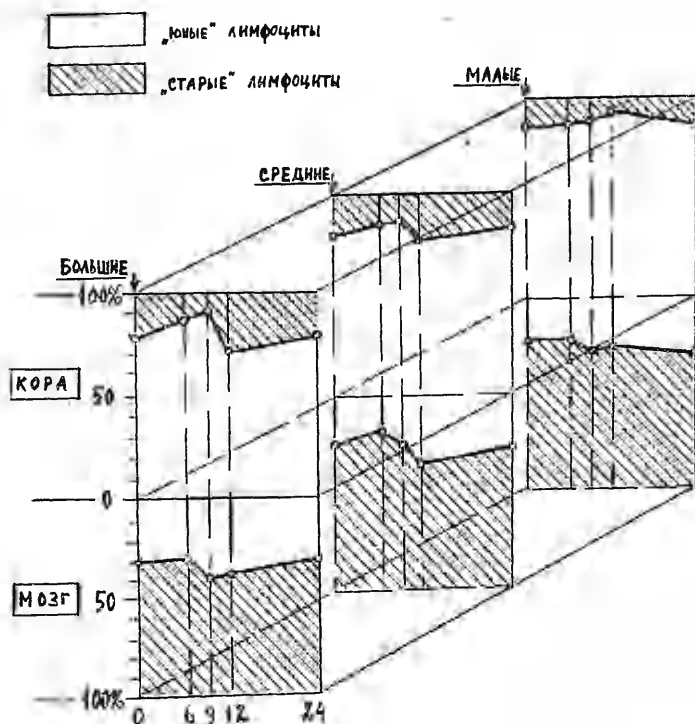


Рис. 5. Характер лимфондной популяции в тимусе цыпленка. На этой схеме 3 рисунка, характеризующих большие, средние и малые лимфоциты коркового (верхние) и мозгового (нижние) вещества. По оси абсцисс — время суток (в часах), по оси ординат — процентные соотношения «юных» (широкоцитоплазматические R-W, узкоцитоплазматические R) и «старых» (широкоцитоплазматические T-S, узкоцитоплазматические W-T-S) лимфоцитов. R — круглое или овальное, W — слегка сдавленное, T — сильно сдавленное и S — сегментированное ядро.

ности, радиочувствительности) лимфоцитов коркового и мозгового вещества долек тимуса, хотя морфогенетически они однородны.

Выводы

1. В тимусе цыплят отмечается четко выраженный суточный ритм изменения количества лимфоцитов. Максимальное увеличение количества больших и средних лимфоцитов наблюдается в 9, малых — в 12 часов и осуществляется за счет: 1) митотического их деления и 2) репопуляции (заселения) органа лимфоцитами из других органов и крови.

В дневные часы происходит выселение лимфоцитов из тимуса.

Все это подтверждает предположение многих современных авторов (Бирринг — Bierring, 1960; Сент-Мари и Леблон, 1958; 1960; Дидергольм — Diderholm, 1961) о рециркуляции лимфоцитов тимуса.

2. В корковом веществе тимуса преобладают юные генерации лимфоцитов, в мозговом, наоборот, более старые.

3. Наши данные, как и данные Леблona и соавт., показывают, что генерации лимфоцитов в тимусе представляют собой последовательные стадии их дифференцировки, и подтверждают точку зрения тех авторов (А. А. Максимов, 1928; А. А. Заварзин, 1945), которые считают, что лимфоциты являются клетками, морфогенетически однородными.

ЛИТЕРАТУРА

- Алов И. А. К вопросу о механизме суточной периодичности митозов. Булл. эксп. биол. и мед., 48, 11, 1959, 107—113. — Алов И. А. Очерки физиологии митотического деления клеток. Медицина, М., 1964. — Заварзин А. А. Очерки эволюционной гистологии крови и соединительной ткани, 1, Медгиз, 1945. — Кассирский И. А. и Алексеев Г. А. Клиническая гематология. 3е изд. Медгиз, М., 1962. — Лурия Е. А. и Фриденштейн А. Я. Роль зубной железы в иммунитете. Усп. совр. биол., 57, 2, 1964, 269—282. — Максимов А. А. The lymphocytes and plasma cells. In: Special Cytology, ed. by E. V. Cowdry, Hoeber, N. Y., 1928, 319—367. — Никитин В. Н. Гематологический атлас сельскохозяйственных и лабораторных животных. Сельхозгиз, 1956. — Хлопин Н. Г. Лимфоциты. БМЭ, 15, 1960, 1211—1216. — Фриденштейн А. Я. Лимфоидная ткань как орган иммунитета. В кн.: Актуальные вопросы иммунологии, под ред. Л. А. Зильбера и П. А. Вершиловой. Медицина, М., 1964, 97—136. — Andreassen E. and Ottesen J. Studies on the lymphocyte production. investigations on the nucleic acid turnover in the lymphoid organs. Acta Physiol. Scand., 10, 3—4, 1945, 258—270. — Arnason B. G., Jankovic B. D. and Waksman B. H. A survey of the thymus and its relation to lymphocytes and immune reactions. Blood, 20, 5, 1962, 617—628. — Azar H. A., Naujoks G. and Williams J. Role of the adult thymus in immune reactions. I. Observations on lymphoid organs, circulating lymphocytes and serum protein fractions of thymectomized adult mice. Am. J. Path., 43, 2, 1963, 213—226. — Bierrig F. Quantitative investigations on the lymphomyeloid system in thymectomized rats. Ciba Symposium on Haemopoiesis. London, 1960, 185—188. — Burnet F. M. The immunological significance of the thymus: An extension of the clonal selection theory of immunity. Australasian Ann. Med., II, 1962, 79—85. — Dameshek W. The Thymus and Lymphoid Proliferation. Blood, 20, 5, 1962, 629—632. — De Robertis E. D. P., Nowinski W. W. and Saez F. A. General Cytology. W. B. Saunders Company, Philadelphia a. London, 1960. — Diderholm H. Studies on the migration and transformation of lymphocytes in immunized and non-immunized animals. Acta Pathol. Scand., Suppl. 51, 1961, 146—151. — Droogleever Fortuyn — van Leyden C. E. Further researches on periodic nuclear division. Proc. Kon. Academie van Wetenschappen te Amsterdam, 27, 1924,

1959—160. — Globerson A., Fiore-Donati L. and Feldman M. On the role of the thymus in recovery of immunological reactivity following x-radiation. *Exptl. Cell Rec.*, 28, 1962, 455—458. — Isakovic K., Jankovic B. D., Popeskovici L. and Milošević D. Effect of neonatal thymectomy, bursectomy and thymo-bursectomy on haemagglutinin production in chickens. *Nature (Engl.)*, 200, 4903, 1963, 273—274. — Kindred J. E. A quantitative study of the hemopoietic organs of the young albino rats. *Am. J. Anat.*, 67, 1940, 99—149. A quantitative study of the hemopoietic organs of the young adult albino rats. *Ibid.*, 71, 1942, 207—243. Quantitative studies on lymphoid tissue. *Ann. N. Y. Ac. Sci.*, 59, 5, 1955, 746—757. — Leblond C. P. and Sainte-Marie G. Models for lymphocyte and plasmocyte formation. *Ciba Symposium on Hemopoiesis*, London, 1960, 152—184. — Martinez C., Kersey J., Papermaster B. W. and Good R. A. Skin homograft survival in thymectomized mice. *Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med.*, 109, 1962, 193—198. — Miller J. F. A. P. Immunological function of the thymus. *Lancet*, 2, 1961, 748—751. — Sainte-Marie G. Lymphocyte formation in the thymus of the rat. In: R. W. Begg, ed., *Proc. 3rd Canad. Cancer Conf.*, N. Y., Acad. Press, 1959, p. 337. — Sainte-Marie G. et Leblond C. P. Tentative pattern for renewal of lymphocytes in cortex of the rat thymus. *Proc. Soc. Exptl. Biol. a. Med.*, 97, 1958, 263—270. — Sherman J. D., Adner M. M. and Dameshek W. Studies on thymectomized hamsters. *Blood*, 20, 6, 1962, 805 (Abstr.). — Szenberg A. and Warner N. L. Breakdown of polyvalent tolerance in the chicken by thymic grafts. *Nature (Engl.)*, 198, 4884, 1963, 1012—1013. — Trowell O. A. Reutilization of lymphocytes in lymphopoiesis. *J. Bioph. a. Bioch. Cytol.*, 3, 2, 1957, 317—318. — Yoffey J. M. The quantitative study of the leucocytes. *Ann. N. Y. Ac. Sci.*, 59, 5, 1955, 938—941.

ON THE RECIRCULATION OF LYMPHOCYTES IN CHICKEN THYMUS

U. Hussar

Summary

The number of various types of lymphocytes of the cortex and medulla of thymus and their mitoses were investigated in 27 3-week-old chicken.

It has been shown that the number of mitoses and the number of various types of lymphocytes reaches its maximum at a different time. The number of the large and medium size lymphocytes on the one hand and that of the small lymphocytes on the other reaches its maximum at different times (at 9 and 12 a.m. accordingly). This fact shows that the various types of lymphocytes (of large, medium and small size) which are recirculating in thymus, represent different stages of differentiation of morphogenetically the same lymphatic cells.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ СУТОЧНЫХ БИОЛОГИЧЕСКИХ РИТМОВ В КОРЕ НАДПОЧЕЧНИКОВ КРЫС

А. Ю. Труупыльд

Лаборатория экспериментальной гистологии Института экспериментальной медицины АМН СССР

В настоящее время можно считать установленным наличие суточного ритмического чередования периодов деятельности и покоя в большинстве органов, в том числе и в корковом веществе надпочечников (Хальберг (Halberg) с соавт., 1953, 1954, 1957, 1959; Мак Карти (McCarthy) с соавт., 1960; Месье (Messier) и Леблон (Leblond), 1960; И. А. Алов, 1964 и др.). Хорошо изучен суточный ритм митозов в зонах коркового вещества у нормальных животных. По данным Мюлемана (Mühlemann) с соавт. (1955, 1956), митотическая активность клеток в коре надпочечников у крыс в вечерние часы выше, чем в утренние. Более подробно исследовался этот вопрос В. Н. Доброхотовым и Р. И. Никаноровой (1962). Они отметили, что в клубочковой зоне максимальное количество клеточных делений падает на поздние вечерние часы и минимальное — на ночные и дневные часы. Наоборот, в пучковой и сетчатой зонах максимальное число митозов приходилось на утренние и дневные часы, минимальное — на поздние вечерние и ночные часы суток.

Необходимо подчеркнуть, что данные о функциональной активности коркового вещества надпочечника в течение суток, полученные с помощью косвенных показателей, например, подсчета количества эозинофилов в периферической крови, во многом противоречивы (Хальберг с соавт. 1957, 1959; И. А. Алов, 1962). Недостаточно еще уделено внимания изучению суточной динамики биологических процессов в коре надпочечника в экспериментальных условиях, и, в частности, совершенно нет данных о суточных функциональных сдвигах при воздействии на организм ионизирующей радиации.

Целью настоящей работы являлось изучение суточного ритма митотической активности и содержания кетостероидов, характеризующих, несомненно, наиболее полно специфическую функ-

цию железы, в зонах коркового вещества крыс в норме и на высоте острой лучевой болезни.

Опыты были поставлены в марте месяце на крысах-самцах весом 200—250 гр. I группа животных (24 крысы) была подвергнута общему рентгеновскому облучению в дозе 800 р, вызывающему острую лучевую болезнь с 70% смертностью животных за 30 дней. Общее облучение производилось на аппаратах РУМ-11 при стандартных условиях. II группа животных (24 крысы) служила контролем. Через 6 суток после облучения, то есть на высоте острой лучевой болезни, опытные животные были забиты на протяжении 1 суток через каждые 3 часа по 3 крысы на каждый срок. Вместе с ними убивались в те же сроки контрольные животные. Один надпочечник (левый) каждой крысы был фиксирован в ценкер-формоле по Максиму и подвергнут обычной гистологической обработке, в другом надпочечнике были выявлены гистохимически кетостероиды по модифицированному нами методу Ашбел и Зелигмана (А. Ю. Труупыльд, 1963, 1965). По этой методике кетостероиды выявлялись в цитоплазме клеток в виде красных зерен; в зависимости от функционального состояния органа гормон обнаруживался или только в наружном отделе пучковой зоны, или также в более глубоких участках коркового вещества, в том числе и в сетчатой зоне. Количественная оценка содержания кетостероидов производилась с помощью условных величин, вычисленных с учетом: 1) интенсивности включения кетостероидов в клетках, 2) процента клеток, содержащих в цитоплазме малое, среднее, большое, очень большое количество гормона, и клеток, не содержащих его вообще, и 3) толщины зоны. Полученные цифровые данные обрабатывались вариационно-статистически.

Учитывая имеющиеся литературные данные (Блюменфельд (Blumenfeld), 1939; Митчелл (Mitchell), 1948, и др.) и результаты предварительных исследований с помощью большого количества гистотопограмм, мы пришли к убеждению, что фигуры митотического деления железистых клеток у взрослых крыс как в норме, так и при лучевой болезни расположены в клубочковой и наружном отделе пучковой зон, которые могут быть рассматриваемы в качестве камбиального участка органа. В более глубоких отделах железы митозы встречаются только в соединительных клетках. Поэтому подсчет количества митозов производился только в вышеуказанных зонах (на 6000 клеток в каждой).

Для сравнения пролиферативных процессов в корковом веществе как целостном органе у нормальных крыс и крыс, находящихся в острой стадии лучевой болезни, вычислялись митотические коэффициенты (МК; количество митозов на 1000 клеток) для камбиальной зоны железы в целом. Результаты сделанных подсчетов показаны графически на рис. 1. Среднесуточ-

ный МК, вычисленный на основе подсчета количества митозов на общее количество 300.000 клеток в восьми сроках, у необлученных животных равен $0,28^{0}_{00}$, а у облученных — $0,33^{0}_{00}$. Сопоставление этих цифр показывает, что никакого подавления митотической активности клеток коркового вещества на вершине острой лучевой болезни, разумеется, нет. Судить о характере суточного ритма по представленным на рис. 1 кривым трудно,

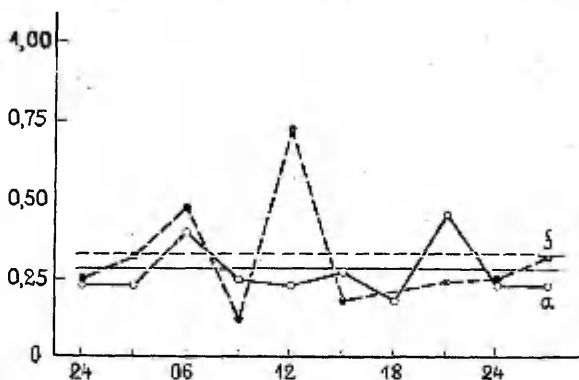


Рис. 1. — Суточный ритм митотической активности клеток в коре надпочечников у необлученных и облученных крыс. По оси абсцисс — часы забоя животных; по оси ординат — МК в ‰; а — МК у необлученных крыс, б — МК у облученных крыс. Сплошная горизонтальная линия — среднесуточный МК для необлученных животных, прерывистая горизонтальная линия — среднесуточный МК для облученных крыс.

так как они отражают суммарные данные о пролиферации клеток в различных зонах, обладающих собственными особенностями. Поэтому для выяснения этого вопроса митотическая активность анализировалась отдельно в клубочковой зоне, с одной стороны, и в наружном отделе пучковой, с другой. Средние для каждой зоны МК, также как и условные величины содержания в них кетостероидов, приведены на таблице 1.

Как видно на рис. 2, у контрольных животных митотическая активность клеток в клубочковой зоне (а) значительно выше, чем в наружном отделе пучковой зоны (б). Максимальный МК в клубочковой зоне приходится утром на 6 часов ($0,68^{0}_{00}$) и вечером на 21 час ($0,73^{0}_{00}$); а минимальный — на 12 час. ($0,17^{0}_{00}$). В пучковой зоне максимальная митотическая активность отмечается в 12 часов ($0,28^{0}_{00}$). Следует отметить, что наши данные о разном уровне митотической активности и несинхронном характере ее суточных изменений в клубочковой и пучковой зонах коркового вещества надпочечников крыс пол-

Таблица 1

Суточная динамика митотической активности и содержания кетостероидов в корковом веществе надпочечников у необлученных и облученных крыс

Время забоя		Кетостероиды (усл. ед.)	МК	
			клубочковая зона	пучковая зона
Контроль	24.00	389 ± 62	0,38 ± 0,09	0,06 ± 0,06
	03.00	480 ± 141	0,28 ± 0,09	0,17 ± 0,09
	06.00	791 ± 177	0,68 ± 0,13	0,11 ± 0,08
	09.00	927 ± 27	0,44 ± 0,21	0,06 ± 0,06
	12.00	1039 ± 302	0,43 ± 0,13	0,28 ± 0,13
	15.00	709 ± 16	0,17 ± 0,08	0,11 ± 0,07
	18.00	673 ± 110	0,30 ± 0,08	0,06 ± 0,06
	21.00	609 ± 127	0,73 ± 0,12	0,17 ± 0,09
800 p	24.00	630 ± 134	0,05 ± 0,05	0,45 ± 0,17
	03.00	320 ± 366	0,07 ± 0,06	0,57 ± 0,17
	06.00	926 ± 308	0,19 ± 0,11	0,76 ± 0,15
	09.00	574 ± 3	0,08 ± 0,08	0,15 ± 0,10
	12.00	1194 ± 346	0,18 ± 0,08	1,27 ± 0,30
	15.00	737 ± 7	0,15 ± 0,10	0,23 ± 0,12
	18.00	701 ± 28	0,26 ± 0,13	0,37 ± 0,14
	21.00	669 ± 124	0,24 ± 0,10	0,24 ± 0,13

ностью совпадают с данными В. Н. Доброхотова и Р. И. Никаноровой (1962).

У облученных крыс, в отличие от необлученных, митотическая активность в пучковой зоне (рис. 2, г) выше, чем в клубочковой (рис. 2, в). Резко выраженный пик МК падает на 12 часов ($1,27^{0/00}$). Если в норме из всего количества митозов приходится на пучковую зону 20%, то при острой лучевой болезни — 80%. Это, несомненно, объясняется тем, что при стрессе именно в пучковой зоне, где происходит образование глюкокортикоидов, секреторный цикл клеток разворачивается в более сжатые сроки и более быстро наступает их изнашивание. А это обуславливает и компенсаторные процессы восстановления.

Представляет интерес сопоставление суточных кривых МК у необлученных и облученных крыс. Как видно на рис. 2, по срокам максимальных и минимальных показателей совпадают кривые митотической активности для 1) клубочковой зоны (а, в) и 2) пучковой зоны (б, г). Наши данные хорошо согласуются с наблюдениями В. И. Булгака (1964), который показал, что в регенерирующей печени на высоте острой лучевой болезни сохраняется суточный ритм митозов.

Кривые, характеризующие суточную динамику содержания кетостероидов в корковом веществе у облученных и необлученных крыс, имеют, в основном, одинаковый характер (рис. 2, д, е;

рис. 3, а, б). В утренние и дневные часы отмечается тенденция к накоплению гормона в железе, причем максимальное содержание его имеет место в 12 час. (рис. 4а, 4в). В вечерние часы происходит выделение гормона из железы, достигающее максимума в 24 часа (рис. 4б, 4г).

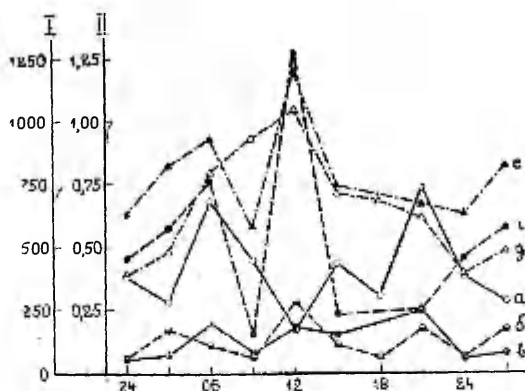


Рис. 2. — Суточный ритм митотической активности клеток и содержания кетостероидов в зонах коркового вещества надпочечников у необлученных и облученных крыс. По оси абсцисс — часы забоя животных; по оси ординат I — содержание кетостероидов в условных единицах, II — МК в $\%$; а — МК в клубочковой зоне (контроль); б — МК в пучковой зоне (контроль); в — МК в клубочковой зоне (800 p); г — МК в пучковой зоне (800 p); д — кетостероиды в корковом веществе (контроль); е — кетостероиды в корковом веществе (800 p).

Естественно, что наши данные интересно было сопоставить с результатами соответствующих физиологических и биохимических исследований, позволяющих судить о физиологической активности органа. Мы решили использовать для сравнения данные Мак Карти с соавт. (1960) о суточных изменениях содержания кортикостерона в периферической крови у крыс. На рис. 3 приведены две кривые в сопоставимом масштабе. Четко видна обратная зависимость между содержанием кортикоидов в железе, с одной стороны, и в периферической крови, с другой. Очевидно, что в вечерние часы, то есть в период общей физиологической активности грызунов, активное поступление гормона в кровь ведет к обеднению коркового вещества кетостероидами. Наоборот, утренний период относительного функционального покоя характеризуется низким содержанием гормона в крови и накоплением его в железе. Этот вывод косвенно подтверждается

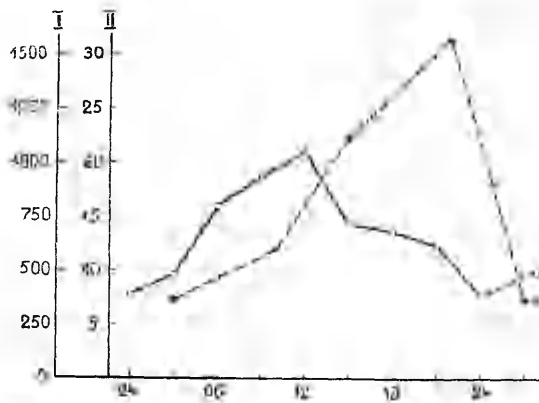


Рис. 3. — Суточный ритм содержания кетостероидов в норме и при острой лучевой болезни. По оси абсцисс часы суток; по оси ординат I — содержание кетостероидов в коре надпочечников в условных единицах, II — содержание кортикостерона в плазме в γ %. а — кетостероиды в корковом веществе надпочечника крыс (собственные данные); б — кортикостерон в плазме крови у крыс по данным Мак Карти с соавт. (1960).

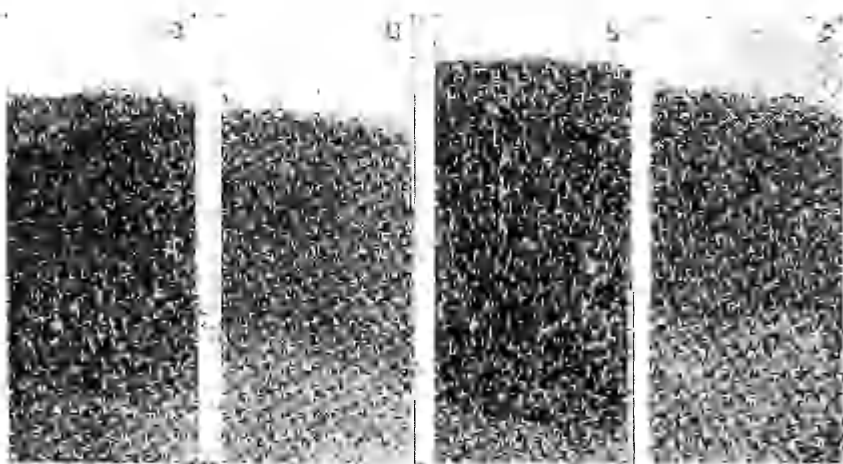


Рис. 4. — Кетостероиды в корковом веществе надпочечника необлученных и облученных крыс. а — необлученная крыса, забита в 12 часов; б — необлученная крыса, забита в 24 часа; в — облученная крыса, забита в 12 часов; г — облученная крыса, забита в 24 часа. Реакция на кетостерониды. Об. 6 х, гомаль II (общее увеличение 50 х).

суточными изменениями количества эозинофилов в периферической крови (Хальберг с соавт., 1953, 1954, 1957, 1959).

Поскольку кетостероиды в первую очередь вырабатываются в пучковой зоне, небезынтересно сравнить кривые содержания кетостероидов (рис. 2д, е) с кривыми МК для этой зоны (рис. 2б, г). Сравниваемые кривые как для контрольных, так и для опытных животных имеют одинаковый характер. В обоих случаях пик митотической активности в пучковой зоне соответствует максимальному содержанию в железе гормона (в 12 час., то есть в период относительного покоя от выделительной и синтетической деятельности). Эти наши данные указывают на наличие обратной зависимости между делением и работой клеток коры надпочечников, подтверждая выводы И. А. Алова (1962, 1964) и других цитологов. Нельзя в то же время не отметить, что максимальная митотическая активность в клубочковой зоне может отмечаться и при среднем уровне содержания гормона в железе.

Выводы

1. При острой лучевой болезни пролиферативные процессы в корковом веществе и, в особенности, в пучковой зоне его, компенсаторно повышены.

2. На высоте острой лучевой болезни у крыс сохраняется суточный ритм митотической активности в зонах коркового вещества и типичные для этого органа суточные изменения в накоплении и выделении кортикостероидов.

3. Клубочковая зона и наружный отдел пучковой зоны, которые могут рассматриваться в качестве камбиального участка органа, обладают разным уровнем и несинхронным ритмом митотической активности.

4. Между митотическим делением и деятельностью железистых клеток в коре надпочечников крыс имеется обратная зависимость.

ЛИТЕРАТУРА

Алов И. А. — О связи между делением и функциональной активностью клеток коры надпочечника. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1962, 9, 87—91. Алов И. А. — Очерки физиологии митотического деления клеток. «Медицина», М., 1964. Булгак В. И. — О суточном ритме митотической активности в регенерирующей печени при острой лучевой болезни. Конференция молодых ученых ИЭМ АМН СССР 23—25 марта 1964 г. Тезисы докладов, стр. 97—98, Л., 1964. Доброхотов В. Н. и Никанорова Р. И. — Суточная периодичность митотического деления клеток в надпочечниках белых крыс. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1962, 9, 91—96. Труупыльд А. Ю. — К методике гистохимического определения кетостероидов. Конференция студентов и аспирантов

морфологических кафедр и лабораторий ленинградских вузов и научно-исследовательских институтов 15—16 мая 1963 г. Тезисы докл., стр. 27—28, Л., 1963; Труупылд А. Ю. — К методике гистохимического выявления кетостероидов в корковом веществе надпочечника. Арх. анат., 1965, 48, 4, 86—90.

Blumenfeld Ch. M. — The effects of ovariectomy on the adrenal glands of the albino rat. *Endocrinology*, 1939, 24, 723—738. Halberg F., Frantz M. J., Bittner J. J. — Phase difference between 24-hour rhythms in cortical adrenal mitoses and blood eosinophils in the mouse. *Anat. Rec.*, 1957, 129, 349—356. Halberg F., Peterson R. E., Silber R. H. — Phase relations of 24-hour periodicities in blood corticosterone, mitoses in cortical adrenal parenchyma and total body activity. *Endocrinology*, 1959, 64, 222—230. Halberg F., Visscher M. B., Bittner J. J. — Eosinophil rhythm in mice; range of occurrence, effects of illumination, feeding and adrenalectomy. *Am. J. Physiol.*, 1953, 174, 109—122. Halberg F., Zander H. A., Houghlum M. W., Mühlemann H. R. — Daily variations in tissue mitoses, blood eosinophils and rectal temperature of rats. *Am. J. Physiol.*, 1954, 177, 361—366. Mc Carthy J. L., Corley R. C., Zarrow M. X. — Diurnal rhythm in plasma corticosterone and lack of diurnal rhythm in plasma compound F-like material in the rat. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1960, 104, 787—789. Messier B., Leblond C. P. — Cell proliferation and migration, as revealed by radioautography after injection of Thymidine — H^3 into male rats and mice. *Am. J. Anat.*, 1960, 106, 247—285. Mitchell R. M. — Histological changes and mitotic activity in the rat adrenal during postnatal development. *Anat. Rec.*, 1948, 101, 161—185. Mühlemann H. R., Marthaler T. M., Loustalot P. — Daily variations in mitotic activity of adrenal cortex, thyroid and oral epithelium of the rat. *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1955, 90, 467—468. Mühlemann H. R., Marthaler T. M., Rateitschak K. H. — Mitosenperiodik in der Nebennierenrinde, Schilddrüse, im Duodenal- und Mundhöhlenepithel der Ratte. *Acta anat. (Basel)*, 1956, 28, 331—341.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF THE DAILY BIOLOGICAL RHYTHM IN THE ADRENAL CORTEX OF RATS

A. Truupõld

Summary

Daily changes of mitotic activity and content of ketosteroids in adrenal cortex in 24 normal rats and in 24 rats 6 days after total X-ray irradiation in single dose of 800 r were investigated. It has been shown that zona glomerulosa and the surface layers of zona fasciculata of the adrenal cortex have a different level and asynchronous frequency of mitotic activity of the cells. There exists an inverse ratio between the mitotic division and the specific function of the cells of the cortex. The proliferative activity in zona fasciculata increase compensatory in acute radiation sickness. Daily frequency of mitotic activity of the cells of the adrenal cortex and typical daily changes in accumulation and withdrawal of the corticosteroids in the highest level of the acute radiation sickness have not disappeared.

О СУТОЧНОМ РИТМЕ МИТОТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ В ПЕРЕХОДНОМ ЭПИТЕЛИИ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ

А. В. Журавлев

Лаборатория экспериментальной гистологии
Института экспериментальной медицины АМН СССР

Физиологические процессы в организме подчинены определенной суточной периодичности, которая, в частности, находит свое отражение в колебаниях митотической активности.

Суточная периодичность митозов в тканях млекопитающих впервые была установлена в 1917 году в работе Дроogleвера Фортуйна — ван Лейдена (Droogleever Fortuyn — van Leijden, 1917), выполненной на ряде эпителиальных тканей. В настоящее время этому вопросу посвящено значительное количество исследований. Показано, что суточный ритм митозов обнаруживается не только при физиологической (Блюменфельд — Blumenfeld, 1942, 1943), но и при репаративной регенерации (Блюменфельд, 1943; М. Т. Гололобова, 1959).

Сколько-нибудь обстоятельных данных относительно суточного ритма митозов в переходном эпителии нет. В работе Леблона, Вульпе и Берталанфи (Leblond, Vulpé a. Bertalanffy, 1955), где этот вопрос затрагивается, данные о суточном ритме были получены попутно при решении других вопросов. По данным этих авторов, в эпителии мочевого пузыря крысы наибольшее число митозов в клетках базальной и покровной зон падает на 12 часов дня. В утренние часы их очень мало. Вторая работа, посвященная суточному ритму клеточного деления в переходном эпителии мочевого пузыря крыс, принадлежит Фудзивара (Fujiwara, 1957). Автор наблюдал очень мало митозов в эпителиальном пласте и описывал суточный ритм амитозов.

Наша работа проводилась на белых крысах-самцах весом 180—200 гр. Для определения суточного ритма крысы забивались через каждые три часа (3, 6, 9, 12, 18, 21, 24). Работа выполнена в конце января. Подсчет митозов производился на срезах толщиной 7 μ для всего пласта в целом и отдельно для клеток покровной зоны. Как известно, митотический коэффи-

циент в многослойных эпителиях кожного типа одни авторы предлагают высчитывать на неделящиеся клетки одного-двух наиболее глубоких слоев эпителия (В. Н. Доброхотов, 1961), другие (Л. Н. Жинкин, В. Я. Бродский и Г. С. Лебедева, 1961) — на один базальный слой. Мы пользовались этим последним методом и вычисляли митотический коэффициент для каждого животного на 6 тысяч неделящихся клеток базальной зоны. Полученные данные подвергались статистической обработке.

Анализ полученных нами результатов показывает, что минимальное число митозов наблюдается в 3 часа ночи, когда митотический коэффициент составляет 0,7 (табл. 1). К 6 часам про-

Т а б л и ц а 1

Суточные колебания МК в ‰

Часы	МК в ‰	
	во всем эпителиальном пласте	в покровной зоне
3	0,7 ± 0,1	0,2 ± 0,1
6	3,2 ± 0,6	1,2 ± 0,2
9	6,3 ± 0,5	0,3 ± 0,1
12	3,0 ± 0,3	0,4 ± 0,1
15	2,7 ± 0,4	0,1 ± 0,1
18	1,5 ± 0,1	0,1 ± 0,1
21	1,4 ± 0,3	0,1 ± 0,1
24	1,1 ± 0,2	0,1 ± 0,1

исходит отчетливо выраженный подъем митотической активности (митотический коэффициент равен 3,2). Максимальное количество митозов обнаружено в 9 часов утра (митотический коэффициент равен 6,3). Различия в числе митозов между утренними часами (9 часов) и вечерними часами (24 часа) статистически достоверны ($P < 0,001$). Суточная кривая митотической активности имеет одновершинный характер (рис. 1). Чрезвычайно интересно, что митотически делящиеся клетки в покровной зоне переходного эпителия также имеют определенные колебания численности в зависимости от времени суток. Их максимальный подъем не совпадает с максимальным подъемом митотической активности эпителиального пласта в целом, он отмечается в 6 часов утра. Число митозов, обнаруженных в покровных клетках в 6 часов утра, достоверно отличается от их количества в 15—24 часа ($P < 0,001$). Среднесуточные митотические коэффициенты достоверно отличаются от максимальных подъемов как во всем пласте ($P < 0,001$), так и в покровной зоне ($P = 0,02$).

В связи со сказанным необходимо коснуться дискутируемого в настоящее время вопроса о способности покровных клеток переходного эпителия к митотическому делению. Как известно, большинство митозов располагается обычно в клетках базальной зоны переходного эпителия (рис. 2а), но наряду с этим, митозы в меньшем количестве также закономерно обнаружи-

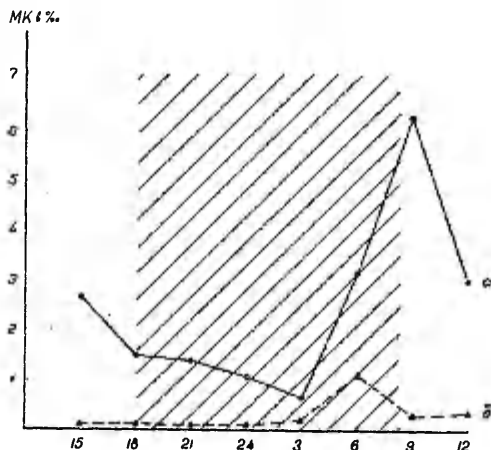


Рис. 1. Суточные колебания митотической активности клеток во всем эпителиальном пласте (а) и в покровной зоне (б) переходного эпителия мочевого пузыря крысы. По оси абсцисс: время суток (часы). По оси ординат: митотический коэффициент (МК — количество митозов на 1000 клеток). Заштрихованы часы темноты.

ваются и в клетках покровной зоны (рис. 2б) (Фудзивара, 1957; Лизон — Leeson, 1962). Отрицание митозов в покровной зоне многими авторами связано, по-видимому, с тем обстоятельством, что забой животных производился ими в дневное время, когда (по нашим данным) количество митозов в покровных клетках ничтожно. Это предположение согласуется с мнением Дроглевера Фортуина — ван Лейдена (1917), который считал, что отсутствие или малое количество митозов в растущих тканях связано с тем, что фиксация материала обычно производится в середине дня.

Митозы в поверхностных клетках переходного эпителия мы наблюдали и ранее при репаративной регенерации слизистой оболочки мочевого пузыря мышей, крыс, кроликов, кошек, собак и обезьян (А. В. Журавлев, 1964). Некоторые из наблюдаемых нами митозов покровной зоны, несомненно, полиплоид-

ные. Это согласуется с выводами Уокера (Walker, 1958) и Л. Н. Жинкина (1962), которые указывают, что процесс дифференциации переходного эпителия связан с полиплоидизацией его клеток.

Весьма существенным является вопрос о двуядерных клетках в покровной зоне переходного эпителия. По нашим данным, каких-либо закономерностей в суточном ритме двуядерных клеток обнаружить не удалось. В абсолютном большинстве статей, учебников и руководств двуядерные и многоядерные клетки расцениваются как результат amitotического деления ядер (Шимонович — Szymonowicz, 1901; Е. С. Данини, 1922; фон Шумахер — von Schumacher, 1943; Гоер — Gauer, 1949). Шаффер (Schaffer, 1933) считает, что в покровных клетках переходного эпителия amitotически путем перешнуровки ядер могут возникать целые скопления. По Такахаши (Takahashi, 1938) на 2300 покровных клеток переходного эпителия мочевого пузыря человека 27,2% составляют двуядерные и многоядерные структуры. В литературе мы не смогли обнаружить данных о последующем делении цитоплазмы после деления ядра в клетках поверхностного слоя переходного эпителия.*

Фудзивара (1956) отмечает, что, хотя ядра поверхностных клеток и делятся путем amitоза, деление цитоплазмы никогда не происходит и в результате возникают многоядерные структуры. Петерсен (Petersen, 1922) рассматривает многоядерность как увеличение поверхности ядерного аппарата.

Совершенно справедливо мнение, высказанное еще в 1904 году В. П. Карповым при описании переходного эпителия мочевого пузыря мыши. «Мы имеем полиморфию ядер с характерным образованием складок; углубление складок приводит к полному перешнуровыванию ядра на равные или неравные части; изменений со стороны ядрышка или хроматина, которые возможно было бы поставить в прямую связь с процессами деления, не наблюдается; деления клеточного ядра не происходит. При таких обстоятельствах немислимо приписывать прямому делению в эпителии пузыря регенеративное значение и вообще видеть в нем процесс одного порядка с кариокинезом» (В. П. Карпов, 1904, стр. 63). Иными словами, ссылки на переходный эпителий как на пример ткани, в которой пролиферация клеток осуществляется путем amitоза, не имеют достаточного основания.

* Указание Фудзивара о имевшей место плазмотомии после amitotического деления ядер в клетках из базальных слоев переходного эпителия мочевого пузыря собаки (1957) не может быть принято во внимание. Анализ микрофотографий №№ 11 и 12, иллюстрирующих это положение, показывает, что в данном случае, по-видимому, имел место механический разрыв тела клетки на гистологическом препарате.

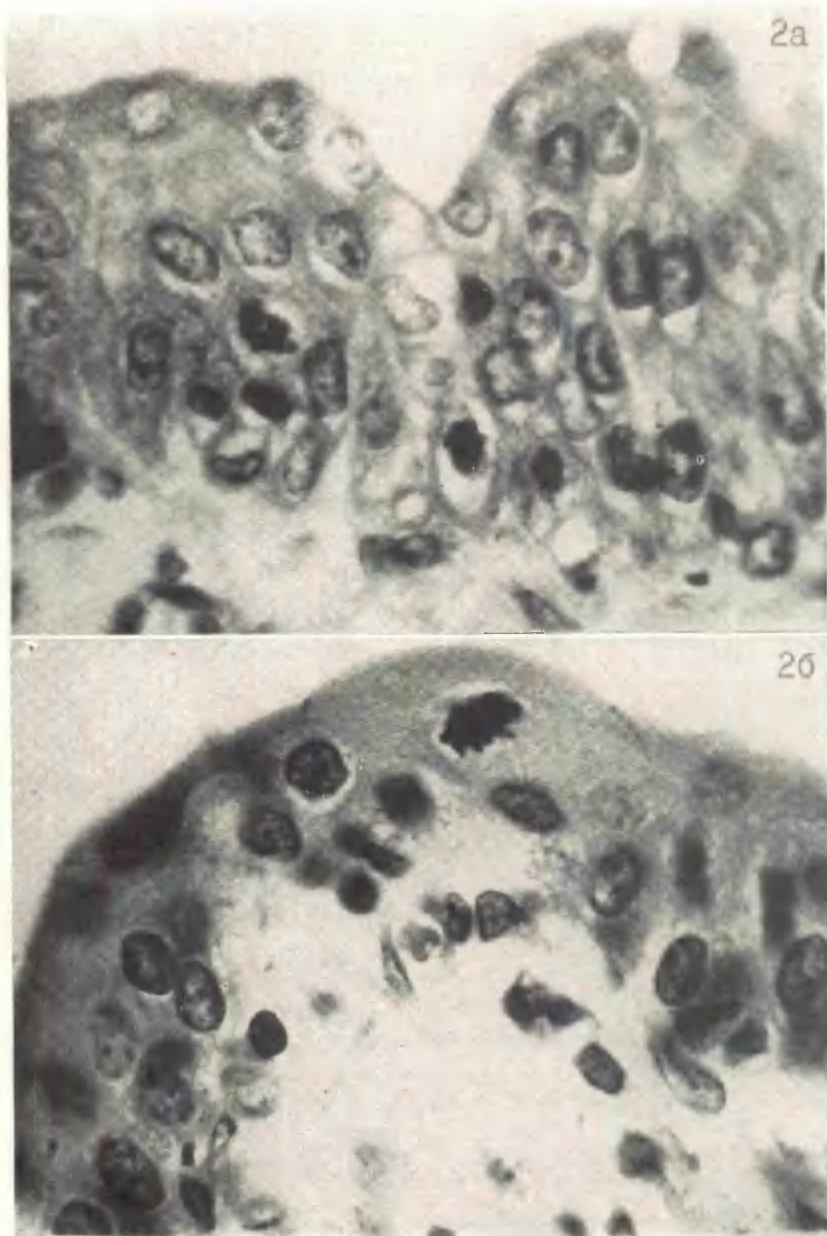


Рис. 2. Митозы в переходном эпителии мочевого пузыря крысы. а — в базальной и б — в покровной зоне. Фиксация Бранка, окраска гемалаун-эозином. Об. 90, ок. 10.

ЛИТЕРАТУРА

Гололобова М. Т. Митотическая активность в роговице мыши при нанесении ожога в различные часы суток. Бюлл. exper. биол. мед., 1959, XLII, 3. — Данини Е. С. К вопросу о строении переходного эпителия. Изв. биол. института и биол. станции при Пермском гос. университете, 1922, 1. — Доброхотов В. Н. Изменения митотической активности при заживлении кожных ран у крыс. В кн.: Проблемы регенерации и клеточного размножения у животных. Под ред. Л. Д. Леоэнера и В. Н. Доброхотова. Тр. Моск. об-ва исп. природы. Отдел биол., т. II, секция гистол. и эмбриол. М., Изд. МГУ, 1961. — Жинкин Л. Н., Бродский В. Я., Лебедева Г. С. Митоз, амитоз и эндомитоз в клетках многослойного плоского эпителия белых крыс. Цитология, 1961, III, 1. — Жинкин Л. Н. Эндомитоз и соматическая полиплоидия у млекопитающих. Арх. анат., гистол. и эмбриол., 1962, XLII, 1. — Журавлев А. В. К вопросу о камбиальных элементах переходного эпителия в связи с его положением в системе эпителиальных тканей. Арх. анат., гистол. и эмбриол., 1964, XLVII, 8. — Карпов В. П. Исследования о прямом делении клеток. Дисс. на степень доктора мед., Москва, 1904.

Blumenfeld C. M. Normal and abnormal mitotic activity. I. Comparison of periodic mitotic activity in epidermis, renal cortex and submaxillary salivary gland of the albino rat. Arch. of Pathol., 1942, 33, 6; II. The rate and the periodicity of the mitotic activity of experimental epidermoid carcinoma in mice. Arch. of Pathol., 1943, 35, 5; III. The rate and the periodicity of mitotic activity in regenerating epidermis of healing wounds in rabbits. Arch. of Pathol., 1943, 36, 5. — Droogleever Fortuyn — van Leijden C. E. Some observations on periodic nuclear division in the cat. Proc. of the sect. of sci. Koninklijke Akad. van Wetenschappen te Amsterdam, 1917, XIX, 1. — Fujiwara I. Studies on the proliferation of the transitional epithelia in the urinary bladder of rat. Acta anat. Nippon., 1956, 31, 6, ref. in Excerpta med., 1958, I, 12; Daily frequency of cell divisions in the urinary bladder epithelia of rat. Acta anat. Nippon, 1957, 32, 5, ref. in Excerpta med., 1959, I, 13; Experimental studies on the proliferation of the transitional epithelia of the urinary bladder in the dog. Acta anat. Nippon, 1957, 32, 6. Studies on the poliferation on the transitional epithelia in the urinary bladder. of dog. Ihinshu Ig. Z., 1957, 6, 1. — Gauer J.-P. Kerngrößenuntersuchungen am Übergangsepithel, ein Beitrag zum Studium der Amitose. Mitteilungen der Naturforschenden Gesellschaft Bern, Neue Folge, P. Haupt Verlag, Bern, 1949, 6. — Leblond C. P., Vulpé M. a. Bertalanffy F. D. Mitotic activity of epithelium of urinary bladder in albino rat. J. of Urol., 1955, 73, 2. — Leeson C. R. Histology, histochemistry and electron microscopy of the transitional epithelium of the rat urinary bladder in response to induced physiological changes. Acta anat., 1962, 48, 4. — Petersen H. Histologie und mikroskopische Anatomie. Erster und zweiter Abschnitt: das Mikroskop und die allgemeine Histologie. Verlag von J. F. Bergmann, München u. Wiesbaden, 1922. — Schaffer I. Lehrbuch der Histologie und Histogenese. Dritte, neubearbeitete Auflage. Urban & Schwarzenberg, Berlin-Wien, 1933. — von Schumacher S. Grundriss der Histologie des Menschen. Sechste Auflage. Springer-Verlag, Wien, 1943. — Szymonowicz L. Lehrbuch der Histologie und der mikroskopischen Anatomie mit besonderer Berücksichtigung des menschlichen Körpers einschliesslich der mikroskopischen Technik. A. Stubers Verlag (C. Kabitzsch), Würzburg, 1901. — Takahashi T. Zur Zytologie der Epithelzellen der Harnblase des Menschen. Okajimas folia anat. Jap., 1938, 16, 4, ref. in Japan. J. of med. sci. (Tokyo), 1940, part I (Anatomy), VIII, 2. — Walker B. E. Poliploidy and differentiation in the transitional epithelium of mouse urinary bladder. Chromosoma, 1958, 9, 2.

DAILY FREQUENCY OF MITOTIC ACTIVITY IN TRANSITIONAL EPITHELIUM OF THE BLADDER

A. V. Zhuravlev

Summary

Daily frequency of mitotic activity in transitional epithelium of the bladder was studied in albino rats. It has been shown that the minimal number of mitosis is observed at 3 a.m. The marked increase of mitotic activity begins at 6 a.m. and reaches its maximum at 9 a.m. Daily curve of mitotic activity is monophasic. Mitosis number in surface cells of transitional epithelium has definite daily variations. The peak of this number does not coincide with that of mitotic activity of the epithelial layer as a whole; the latter taking place at 6 a.m. The role of mitosis and amitosis in cell proliferation of transitional epithelium is discussed.

РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ КОЖНОГО И КИШЕЧНОГО ЭПИТЕЛИЕВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ОБЛУЧЕНИЯ

К. М. Светикова

Лаборатория экспериментальной гистологии Института экспериментальной медицины АМН СССР

В настоящем сообщении сопоставляются результаты наших отдельных работ по изучению репаративной регенерации кожного и кишечного эпителиев при различных условиях облучения (К. М. Светикова 1961, 1963, 1964).

Было поставлено 5 серий опытов на 255 белых крысах-самцах, у которых производился ожог кожного и кишечного эпителиев на месте анального стыка. При этом стенка прямой кишки повреждалась до *tunica muscularis mucosae*, а эпидермис — вместе с частью *stratum reticulare*.

В I серии опытов («контрольной») ожог наносился необлученным животным; во II серии — через 1,5—2 часа после местного однократного рентгеновского облучения тазовой области в дозе 1000 *p*; в III серии — через 4 суток после однократного общего облучения в дозе 800 *p*, вызывающей у всех животных острую лучевую болезнь; в IV серии — через 1,5—2 часа после местного однократного облучения в дозе 6000 *p* и в V серии — через 1—2 часа после местного дробного облучения в суммарной дозе 6000 и 12000 *p* (однократная доза 400 *p* с интервалами в 3—4 суток). Облучение во всех случаях производилось при стандартных условиях.

Гистологически исследовался только материал от выживших животных в сроки от 5 мин. до 45 суток после ожога. Фиксация производилась в жидкости Карнуа, Браунка или ценкер-формоле. Парафиновые срезы окрашивались гематоксилин-эозином, азур II-эозином, по Маллори, Фельгену, по Шабадашу-Хочкису и на микроорганизмы по Грам-Вейгерту.

Как известно (А. А. Заварзин, 1930; Н. Г. Хлопин, 1935; А. Ж. Блюмберг, 1950), кожный эпителий на границе с эпителием прямой кишки имеет некоторые особенности (рис. 1а):

он утолщен и на некотором протяжении лишен волосяных фолликулов и сальных желез. Кишечные крипты у края более низкие и широкие, иногда имеют наклонное положение. Каждому эпителию соответствует свойственная ему соединительная ткань:

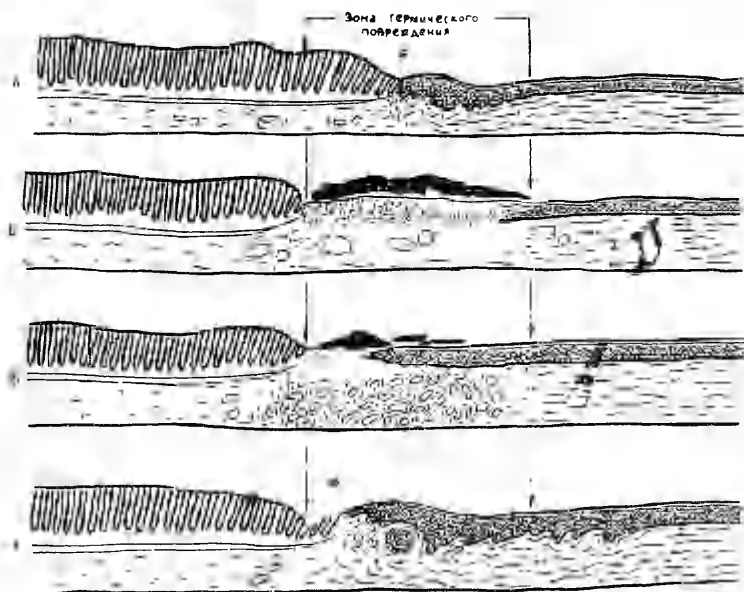


Рис. 1. Отдельные этапы процесса посттравматической регенерации кожного и кишечного эпителиев на месте их стыка у необлученных (контрольных) животных и при местном однократном облучении в дозе 1000 *p*. а — место стыка в норме; б — место стыка через 1—3 суток и в — через 7—10 суток после ожога у контрольных животных и местного облучения в дозе 1000 *p*; г — новообразованные эпителии с новым местом стыка у контрольных и место облученных в дозе 1000 *p* животных через 20—30 суток после ожога. Условные обозначения для этого и всех следующих рисунков: Кишечный эпителий показан слева, кожный — справа. Звездочкой обозначено место стыка. Область термического повреждения отмечена вертикальными линиями со стрелками; зона облучения — горизонтальными линиями со знаком действия лучистой энергии (☆). Точками обозначены участки тканей с выраженной лейкоцитарной реакцией; зачерненные участки — места скопления микробов и некротизированных тканей; кружочками обозначены старые сосуды и новообразованные сосуды грануляционной ткани. Горизонтальными короткими тонкими волнистыми линиями обозначены пучки коллагеновых волокон.

кишечному — ретикулярного характера, а кожному — рыхлая соединительная с преобладанием коллагеновых компонентов в промежуточном веществе. Наблюдается лейкоцитарная инфильтрация подлежащей ткани. Митотическая активность эпители-

альных клеток у места стыка повышенная. Как подчеркивает А. С. Лежава (1959), и в обычных условиях может иметь место некоторое смещение границ между эпителиями в краниальном направлении.

У контрольных необлученных животных на месте ожога воспалительная реакция развивается с первых часов, а через 1 сутки хорошо выражен лейкоцитарный вал (рис. 1б). Неповрежденный эпителий кожи и ее придатков и эпителий кишки в крае раны подвергаются перестройке. Край дедифференцированного кожного эпителия погружается под лейкоцитарный вал и в виде многослойного пласта растет по жизнеспособным тканям. Количество митозов в неповрежденном эпидермисе через 1 сутки начинает увеличиваться. Через 3—4 суток в шиповатых клетках регенерата накапливается гликоген, который сохраняется в клетках участка регенерата, граничащего с краем роста, до полной эпителизации раны и образования нового смежного участка эпителиев. Дедифференцированный кишечный эпителий нарастает на раневую поверхность в виде одного слоя уплощенных клеток. Количество слизи в бокаловидных клетках, входящих в регенерат, уменьшается. Количество митозов в первых криптах тоже возрастает. Через 2 суток начинается развитие грануляционной ткани. Кишечный эпителий, продвинувшийся по раневой поверхности, в дальнейшем дегенерирует. Образование кишечного регенерата начинается через 10—15 суток, когда грануляционная ткань заполняет всю рану (рис. 1в). Через 20—30 суток рана обычно полностью перекрыта двумя эпителиями (рис. 1г). При этом происходит смещение первоначальной границы эпителиев в краниальном направлении, как было ранее отмечено А. Ж. Блюмбергом (1950). В процессе эпителизации раны кожный эпителий дает разрастания в подлежащую ткань, которые по своему значению должны быть отнесены к воспалительным (В. Г. Гаршин, 1939). Под новообразованным кожным эпителием подлежащая ткань приобретает строение рыхлой соединительной ткани, а под кишечным она сохраняет ретикулярный характер.

После однократного местного облучения в дозе 1000 *p* происходит кратковременное подавление митотического деления клеток, которое восстанавливается полностью только через 2 суток. Наряду с правильными митозами встречаются и неправильные, однако количество их постепенно снижается. В облученных тканях наблюдается гиперемия и мелкие кровоизлияния. Указанные изменения, однако, не сказываются на общем ходе регенерации. Она протекает так же и в те же сроки, как и у контрольных животных (рис. 1б, в, г). Каких-либо отклонений в распределении РНК в эпителиальных и соединительнотканых клетках не было отмечено. Смещение первоначальной границы эпителиев происходит в той же степени, что и в контроле.

После общего облучения в дозе 800 *p*, вызывающей у всех животных острую лучевую болезнь, процесс регенерации протекал в условиях резко выраженной лейкопении. Митотическая активность клеток к моменту нанесения травмы (через 4 суток после облучения) восстанавливается. Перестройка и рост эпителиев начинаются в те же сроки, что и в контроле. Но процесс регенерации протекал у отдельных животных неодинаково. У некоторых крыс лейкоцитарный вал образовывался своевременно, и инфекция в ране развивалась. Регенерация в этих случаях протекала и заканчивалась так же, как и в контроле (рис. 1*р*). У большей же части крыс регенерация протекает медленнее, несмотря на высокую митотическую активность клеток. В этих случаях лейкоцитарная реакция выражена слабо (рис. 2*а*).

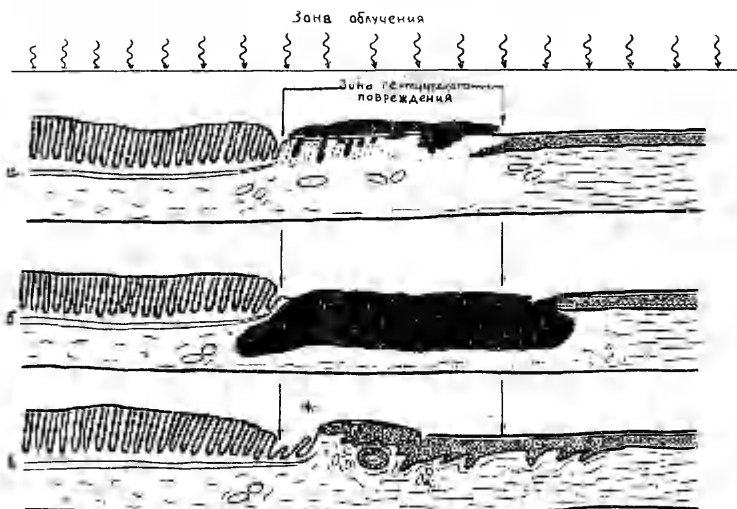


Рис. 2. Отдельные этапы процесса посттравматической регенерации кожного и кишечного эпителиев на месте их стыка при острой лучевой болезни, вызванной общим облучением в дозе 800 *p*. а — через 1—3 суток после ожога (5—7 суток после облучения); б — через 7—10 суток после ожога (11—14 суток после облучения); в — новообразованные эпителии с новым местом стыка через 30—45 суток после ожога (34—49 суток после облучения). (Обозначения см. рис. 1).

Поэтому микроорганизмы свободно проникают в глубину тканей, где и развиваются. Регенерат кожного эпителия и часть старого эпидермиса с подлежащей тканью в соседстве с местами скопления микроорганизмов (на поверхности раны — кокки, а в глубине — граммотрицательные палочки) подвергаются дегенерации (рис. 2*б*). Вследствие этого раневая поверхность резко увеличивается. Развитию дегенеративных изменений, по-види-

тому, способствуют и диффузные кровоизлияния, характерные для острой лучевой болезни. В кишечном эпителии дистрофических изменений не наблюдается. Он оказывается более стойким по отношению к инфекции. Начиная с 10 суток повышается уровень лейкоцитов в периферической крови, усиливается воспалительная реакция, начинается очищение раны от продуктов распада. В этих условиях процесс регенерации заканчивается через 30—45 суток после ожога (рис. 2в). Степень смещения первоначальной границы эпителиев почти не отличается от контроля.

После местного однократного облучения в дозе 6000 *p* процесс регенерации протекал на фоне глубоких дистрофических изменений в облученных тазовых органах с отеком, кровоизлияниями, эпипляцией кожи и пр.. Митотическая активность клеток подавлена полностью на протяжении двух суток, неправильные митозы встречаются в большем количестве, чем при облучении в дозах 800 и 1000 *p*. Процесс регенерации на протяжении первых двух суток протекал, как в контроле. Через 3 суток начинали выявляться радиационные изменения в облученном кишечном эпителии: появлялись многоядерные клетки и клетки с гигантскими ядрами. В дальнейшем облученный кишечный эпителий погибает (рис. 3а). В подлежащей ткани развивается острое воспаление. В облученном кожном эпителии радиационные изменения развиваются позднее: эпителиальный пласт истончается и на многих участках исчезает через 15 суток после облучения (рис. 3б).

Эпителий глубоких частей волосяных фолликулов и сальных желез сохраняется лучше. Из него происходит рост эпителиального пласта. Обычно в подлежащей ткани развивается инфекция, благодаря чему растущий кожный эпителий также образует разрастания воспалительного характера. Кишечный эпителий растет только от необлученных участков и по поверхности продвигается мало. К 45 суткам рана почти или полностью эпителизирована кожным эпителием. Граница эпителиев смещается на всю зону облучения (рис. 3в).

После местного дробного облучения в суммарной дозе 6000 и 12000 *p* митотическая активность клеток как в кожном, так и в кишечном эпителии значительно снижена, но не подавлена полностью. Часто встречаются неправильные митозы. Дистрофические изменения в кишечном эпителии незначительны. В кожном эпителии признаков радиационного повреждения не отмечается. В ходе реактивных изменений после ожога выявляется радиационное повреждение соединительной ткани: коллагеновые волокна утолщаются и подвергаются гиалинозу (рис. 4а); образуются гигантские фибробласты. Они были описаны неоднократно после облучения массивными дозами (А. А. Максимов, 1923; О. Любарш и И. Ветъен, 1927; Г. В. Ясвоин, 1932 и

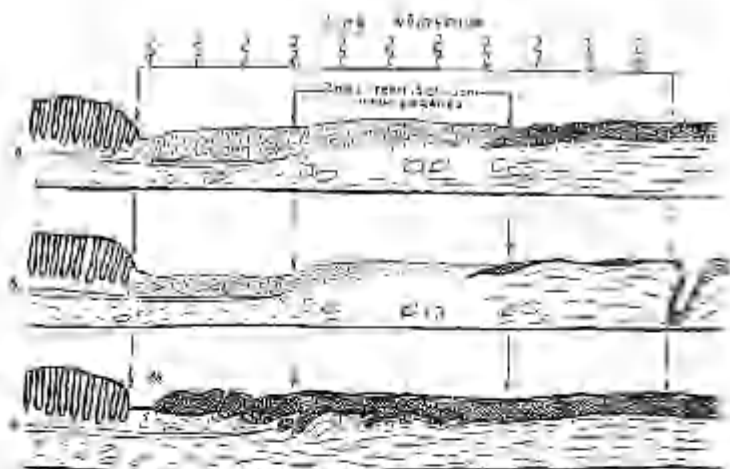


Рис. 3. Отдельные этапы процесса посттравматической регенерации кожного и кишечного эпителиев на месте их стыка при местном однократном облучении в дозе 6000 р. а — место стыка через 4—7 суток после облучения и ожога; б — место стыка через 10—15 суток после облучения и ожога; в — новообразованные эпителии с новым местом стыка через 45 суток после облучения и ожога. (Обозначения см. рис. 1).

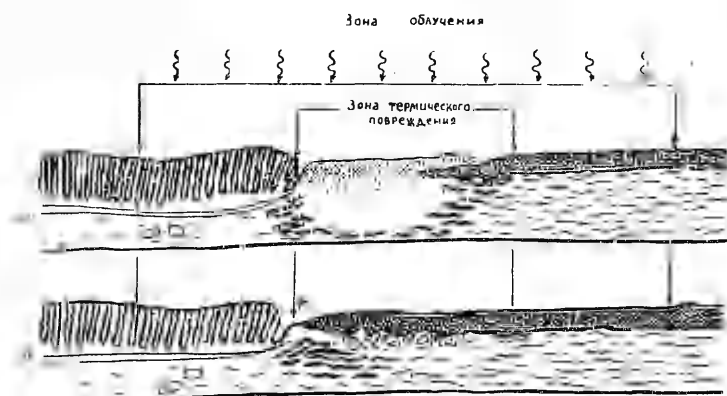


Рис. 4. Отдельные этапы процесса репаративной регенерации кожного и кишечного эпителиев на месте их стыка после ожога и местного дробного облучения в дозе 6000 р. и 12000 р. а — место стыка через 7—10 суток после ожога; б — новообразованные эпителии с новым местом стыка через 45 суток после ожога. Толстыми волнистыми короткими линиями обозначены гиалицизированные коллагеновые волокна. Остальные обозначения см. рис. 1.

др.). Кишечный эпителий не образует регенерата. Это связано с тем, что грануляционной ткани как таковой в ране не возникает: под кишечным краем раны соединительная ткань представлена утолщенными гиалинизированными коллагеновыми волокнами и единичными фибробластами, кровеносных капилляров в этой ткани нет. В контроле к этому сроку почти вся рана заполнена молодой соединительной тканью, богатой сосудами. Кожный эпителий растет по измененной соединительной ткани медленнее, несмотря на то, что митотическая активность в нем восстанавливается. В клетках эпидермального регенерата содержится гликоген. Через 45 суток рана вся эпителизирована многослойным эпителием (рис. 46). Под ним формируется характерная для кожи соединительная ткань за счет врастания соединительнотканых элементов и сосудов из необлученных участков. Первоначальная граница эпителиев смещается в сторону кишки на величину всего термического повреждения (рис. 46).

Сопоставление результатов, полученных во всех сериях опытов, позволяет установить конкретные причины замедления процесса регенерации при различных условиях облучения. При острой лучевой болезни в наших опытах, как ранее было отмечено В. П. Михайловым (1958), Е. В. Дмитриевой (1959, 1962), Т. Л. Соповой (1959) и другими авторами, основное значение имеют общие нарушения функций целостного организма, способствующие развитию инфекции при выраженной лейкопении и нарушению иммунологической реактивности организма, тогда как регенеративные потенции самих тканей сохраняются. Особенно наглядно это видно на примере местного облучения в дозе 1000 *p*, когда ткани облучены на 200 *p* больше по сравнению с общим облучением, а регенерация идет как в контроле. При однократном местном облучении в дозе 6000 *p* основной причиной замедления течения процесса регенерации является радиационное повреждение самих тканей, а при местном дробном облучении массивными дозами — нарушение коррелятивных отношений между эпителием и соединительной тканью. Значение коррелятивных взаимоотношений тканевых структур в процессе регенерации подчеркивалось В. Г. Гаршиным (1951) и др.

Выяснение конкретных причин замедления регенерации дает возможность ближе подойти к попытке активного вмешательства в восстановительные процессы на тканевом уровне после лучевых воздействий.

Помимо этих выводов радиологического характера, в ходе работы получен ряд фактов, представляющих общепатологический интерес. Установлено, что в процессе регенерации при различных дозах общего и местного облучения эпителии кожного и кишечного типа сохраняют тканевую детерминацию. Во всех

проделанных опытах ни разу не удалось получить картин, говорящих о метаплазии эпителиев.

Изучение хода процесса регенерации различных эпителиев при острой лучевой болезни позволяет сделать вывод, что эпителии кожного и кишечного типа по-разному относятся к воздействию инфекции. По-видимому, это свойство, как и разная радиочувствительность эпителиев, установленная в наших опытах, говорит о разной биологии этих тканей.

Смещение первоначальной границы эпителиев в различных опытах следует рассматривать как проявление регенераторного меторизиса (В. М. Шимкевич, 1908; А. Г. Кнорре и В. П. Михайлов, 1961).

В опытах четко выявилось значение коррелятивных взаимоотношений эпителия с подлежащей тканью: зависимость роста кишечного эпителия от состояния подстилки и влияние эпителия на характер дифференцировки соединительной ткани. При образовании одного или нескольких смежных участков, в процессе регенерации под многослойным эпителием соединительная ткань приобретает свойства, типичные для кожи, а под кишечным сохраняется ткань типа ретикулярной.

Гликогенообразование в регенерате кожного эпителия при различных условиях облучения сохраняется.

ЛИТЕРАТУРА

Блюмберг А. Ж. Экспериментально-гистологические исследования эпителиев кожного и кишечного типов в смежном участке. Дисс., ВМА им. Кирова, Л., 1950. Гаршин В. Г. Воспалительные разрастания эпителия и их биологическое значение и отношение к проблеме рака. Медгиз, М., 1939. Гаршин В. Г. Об эпителизации ран. В кн.: Н. Н. Аничков, К. Г. Волкова и В. Г. Гаршин. «Морфология заживления ран.» ИЭМ АМН СССР, Москва, 1951. Дмитриева Е. В. Сравнительное изучение скелетной мускулатуры крысы при лучевой болезни в условиях непрямого и прямого воздействия рентгеновых лучей. В сб.: «Восстановительные и компенсаторные процессы при лучевой болезни.» Л., Медгиз, 1959. Дмитриева Е. В. Посттравматическая регенерация слизистой тонкой кишки при острой лучевой болезни. Арх. анат., 1962. 4. Заварзин А. А. Курс микроскопической анатомии. М.—Л., Госиздат, 1930. Кнорре А. Г., Михайлов В. П. Принцип меторизиса В. М. Шимкевича и его значение для гистологии. Арх. анат., 1961. 1. Лежава А. С. Разъединение эпидермальным эпителием энтеродермального эпителия в обычных условиях жизнедеятельности организма. Тез. гистол. конф. 12—15 октября 1959. Максимов А. А. Studies on the changes produced by Roentgen rays in inflamed connective tissue, Exp. Med., 1928, v. 37, № 3. Михайлов В. П. Регенерация тканей при лучевой болезни. Докл. VI Всесоюз. съезда анат., гист. и эмбриол. Киев, 8—14 июля 1958. Светикова К. М. Посттравматическая регенерация кишечного и кожного эпителиев на месте анального стыка после рентгеновского облучения. Тр. ИЭМ АМН СССР, «Ежегодник» за 1960 г. Л., 1961. Светикова К. М. Репаративная регенерация кожного и кишечного эпи-

телиев на месте анального стыка при острой лучевой болезни. Арх. анат. 1963, 10. Светикова К. М. Репаративная регенерация кожного и кишечного эпителия при местном и общем облучении. Сб. статей «Восстановительные процессы при радиационных поражениях.» Атомиздат, М., 1964. Сопова Т. Л. Патоморфология заживления ран, зараженных анаэробами, у животных с острой лучевой болезнью. Сб. «Восстановительные и компенсаторные процессы при лучевой болезни.» JL, 1959. Хлопин Н. Г. О некоторых особенностях и значении пограничных участков между покровными и эпителиальными пластами различного строения в пищеварительном аппарате. Сб., посвящ. 25-летию науч. деят. Н. Н. Аничкова. ВИЭМ, Л., 1935. Шимкевич В. М. Меторизис как эмбриологический принцип. Изв. Имп. АН, VI серия, 1908, 18. Ясвоин Г. В. Экспериментальные исследования над действием рентгеновых лучей на соединительную ткань. Вестник рентгенол. и радиол. Гос. рентгенологического и радиологического ин-та. Т. 1932, вып. 1, т. XI. Lubarsch O. u. Wätjen I. Handbuch d. ges. Strahlenheilkunde. Biologie, Pathologie u. Therapie. Lazarus, München, 1927, Bd. 1.

REPARATIVE REGENERATION OF SKIN AND INTESTINE EPITHELIA UNDER VARIOUS CONDITIONS OF IRRADIATION

K. M. Svetikova

Summary

The reparative regeneration of skin and intestine epithelia at the site of their anal junction has been studied in adult albino rats. Thermic injury was inflicted upon this area after total X-ray irradiation (800 r) which produced acute irradiation sickness, after local single dose irradiation (1000 and 6000 r), and local fractional irradiation (6000 and 12000 r) — a single dose amounting to 400 r with 3—4 day intervals.

Actual causes of the delayed reparative regeneration process have been discovered: in acute irradiation sickness — and infection developing against the background of pronounced leucopenia and lowered immunologic reactivity of the organism; in local single dose irradiation (6000 r) — a direct radiation effect exerted on the tissues; in local fractional irradiation (6000 and 12000 r) — a disturbed correlation of the epithelia and the underlying tissue. In all of our experiments the intestinal and cutaneous epithelia maintained their tissual specificity. One type of epithelium was never found to convert into another. Radiosensitivity of the skin and intestine epithelia as well as their behaviour towards the infection being not alike, the biology of these tissues of different origin is proved not to be identical.

ПРОЛИФЕРАЦИЯ КЛЕТОК ОБЛУЧЕННОЙ ПЕЧЕНИ, ИМПЛАНТИРОВАННОЙ В ОЧАГ АСЕПТИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

В. И. Булгак

Лаборатория экспериментальной гистологии Института экспериментальной
медицины АМН СССР

В настоящее время не существует единой точки зрения по вопросу о радиационной чувствительности ткани печени. Большинство авторов, начиная с Селдин (Seldin, 1904), считают, что печень отличается сравнительной устойчивостью к воздействию радиационных излучений. Поул и Бантинг (Pohle a. Bunting, 1932) после местного рентгеновского облучения печени взрослых крыс в дозах от 600 до 2500 *p* не обнаружили картин некроза клеток ее паренхимы и желчных путей. Результаты исследований, проведенных Родсом (Rhoades, 1948) над печенью кроликов, крыс, мышей и морских свинок, подвергшихся общему рентгеновскому облучению в дозах от 25 до 1200 *p*, показали, что наблюдаемые изменения в ее тканях являются вторичными. Они возникают в результате общего токсического действия, обусловленного гибелью клеток некоторых радиочувствительных тканей; эпителий же печени высокорезистентен. На 3-и сутки после местного рентгеновского облучения печени кроликов в дозе 3000 *p* были обнаружены очажки некроза отдельных печеночных клеток. На 7-й день нормальное строение органа полностью восстанавливалось (Ариел — Ariel, 1951). В. Блум и М. Блум (W. Bloom a. M. Bloom, 1954) относят эпителий печени и желчных путей к тканям с высокой радиорезистентностью. Другой точки зрения придерживаются Г. С. Стрелин и И. В. Шиффер (1963). Изучая течение регенерации печени мышей после частичной гепатэктомии в условиях однократного общего облучения γ -лучами Co^{60} в дозе 1000 *p*, они пришли к заключению, что «этот орган чувствителен к облучению» (стр. 89).

Несмотря на отсутствие признаков морфологических изменений в печени после воздействия ионизирующей радиации, об-

менные процессы нарушаются: у облученных животных наблюдается жировая инфильтрация печени (Эллинггер — Ellinger, 1945), в течение первых двух дней происходит снижение содержания холестерина и повышение содержания гликогена (Норт и Нимс — North a. Nims, 1949).

Степень радиационной чувствительности клеток печени можно выяснить, изучая их способность к митотическому делению после облучения различными дозами. В настоящей работе была поставлена задача выяснить способность клеток облученной печени к пролиферации в очаге асептического воспаления по методу Ф. М. Лазаренко (1939, 1959). Как известно, этот метод заключается в имплантации под кожу животным измельченных фрагментов исследуемого органа вместе с кусочками целлоидина. В образующемся очаге асептического воспаления развивается молодая грануляционная ткань и создаются условия, благоприятствующие размножению клеток имплантированных тканей. В лаборатории Ф. М. Лазаренко этим методом О. П. Ржевуцкая изучала рост печеночной ткани кроликов (1938). По ее данным в пересаженных кусочках, окруженных молодой соединительной тканью, через 2 суток начинают митотически делиться клетки желчных протоков, за счет которых образуются эпителиальные трубочки различного размера. Через 3 суток обнаруживается пролиферация печеночных клеток, которые в дальнейшем образуют тяжи и трубки, состоящие из однослойного эпителия.

Опыты поставлены на 30 белых крысах (самцах) весом 100—150 гр. Постановка опытов изображена на схеме (рис. 1): под кожу крыс имплантировались с правой стороны смеси кусочков целлоидина и печени от необлученных 3—7-дневных крысят (контроль), с левой смеси целлоидина и печени от такого же возраста крысят, которые за час до операции подвергались общему однократному рентгеновскому облучению в дозе 2000 *p* при стандартных условиях на аппарате РУМ-11. Такая постановка опытов обеспечивала одинаковые биологические условия для роста имплантированных кусочков. Имплантаты извлекались вместе с окружающими тканями через 2, 3, 5, 7, 14 и 21 суток после операции. Материал фиксировался в жидкостях Бранка и Карнуа. Парафиновые срезы окрашивались гемалаун-эозином, азури-II-эозином, по Фельгену и на гликоген по Бесту.

Прежде чем изложить наблюдаемые нами изменения в имплантатах, необходимо кратко описать строение печени новорожденных крысят. Благодаря слабому развитию междольковой соединительной ткани и крупному диаметру кровеносных капилляров, находящихся между балками, дольчатое строение печени выражено плохо (рис. 2). Среди печеночных клеток обнаруживаются очаги миелоидного кроветворения и мегакариоциты

(А. А. Максимов, 1927). Подавляющее большинство печеночных клеток одноядерные, среди них встречаются митозы.

В организме крысы-реципиента воспалительная реакция на необлученные и облученные имплантаты развивается совершенно одинаково. Через 2 суток из окружающей соединительной ткани в имплантаты вырастает много кровеносных капилляров. Между кусочками печени и целлоидина образуются прослойки, заполненные молодой грануляционной тканью, которая содержит помимо кровеносных капилляров и оседлых фибро-

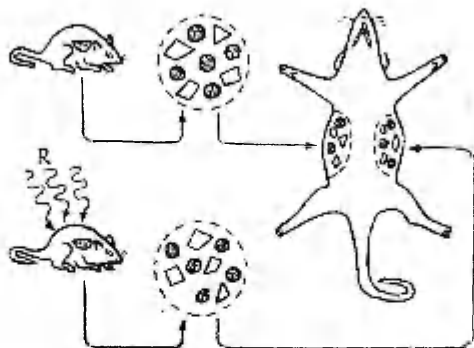


Рис. 1. Схема постановки опытов. Под кожу крыс (реципиентов) имплантировались: с правой стороны смеси кусочков целлоидина и печени от необлученных крысят (доноров), с левой — смеси кусочков целлоидина и печени от крысят, которые облучались в дозе 2000 р.

бластов большое количество лейкоцитов. Вокруг кусочков целлоидина образуется много гигантских многоядерных клеток на введенные инородные тела (А. А. Максимов, 1904). Несомненно, в образовании соединительной ткани принимают участие не только клетки реципиента, но и печени (донора). Этот вопрос, также как и те изменения, которые претерпевают клетки миелоидных очагов кроветворения печени в имплантатах, подлежит дальнейшему изучению. Здесь необходимо отметить только следующее. Несмотря на то, что развитие грануляционной ткани в необлученных и облученных имплантатах протекает идентично, в последних все же удастся отличить фибробласты, которые были занесены с кусочками пересаженной печени от фибробластов реципиента. В занесенных фибробластах отмечаются признаки радиационного повреждения, характеризующиеся увеличением ядра и тела клеток. Такие радиационные повреждения соединительнотканых клеток были описаны рядом авторов начиная с А. А. Максимова в 1923 г. и Г. В. Ясвина в 1932 г.

В дальнейшем (через 14—21 сутки) дифференцированная грануляционная ткань с развившимися в ней коллагеновыми волокнами образует вокруг имплантатов фиброзную капсулу.

После механического измельчения ткани периферические клетки пересаженных кусочков печени травмируются при операции и погибают. Как в необлученных, так и в облученных имплантатах центральная часть кусочков вследствие нарушения питания подвергается дегенеративным изменениям: цитоплазма печеночных клеток начинает интенсивно окрашиваться эозином, ядра их сморщиваются и в дальнейшем подвергаются лизису. Неповрежденные же печеночные клетки сохраняют хорошую способность к дальнейшей пролиферации. Первые реактивные изменения наблюдаются в кусочках печени, пересаженных от необлученных крысят, уже через 2 суток. С этого срока печеночные клетки почти полностью теряют гликоген. Вместо скопления крупных глыбок его в цитоплазме, обнаруживаются только отдельные мелкие зернышки. Они обычно увеличены в объеме, цитоплазма их принимает более гомогенный характер и резко выраженную базофилию. В части клеток видны митозы. В результате размножения и передвижения печеночных клеток в грануляционной ткани образуются трубочки и тяжи, среди образующих их клеток имеются двуядерные. В облученных имплантатах через 2 суток митотического деления печеночных клеток еще не наблюдается. Реакция со стороны сохранившихся желчных протоков в необлученных и облученных имплантатах выявляется через 2 суток и протекает примерно одинаково. Среди клеток, выстилающих желчные протоки, встречается много клеток в состоянии митотического деления. В результате этого на 2-е сутки имплантации образуются новые эпителиальные трубочки (рис. 3).

Через 5 суток в облученных имплантатах появляются митозы и в печеночных клетках (рис. 4). В большинстве случаев они, также как и митозы в клетках желчных протоков, имеют патологический характер (наличие мостиков в анафазе, набухание хромосом и их слипание). В результате пролиферации клеток желчных протоков и печеночных клеток образуются эпителиальные трубки и тяжи, которые врастают в соединительную ткань (рис. 5). Образующие их клетки схожи по своей структуре: они имеют округлое ядро с 1—2 ядрышками и мелкой хроматиновой зернистостью: как в необлученных, так и в облученных имплантатах цитоплазма их гомогенна и слегка базофильна, что свидетельствует о повышенном содержании в ней РНК. Отдельные клетки имеют 2 ядра. Таким образом, на стадии пролиферации становится уже трудно различить, какие из новообразованных эпителиальных структур развились из печеночных клеток, а какие из клеток желчных протоков. Этот момент отмечал и Ф. М. Лазаренко.

На стадии 7 суток в новообразованных эпителиальных разрастаниях многие клетки еще продолжают делиться митозом; в последующие сроки деления эпителиальных клеток нами не было обнаружено. Это связано с развитием фиброзной ткани в связи с развитием дистрофических изменений и нарушением трофики имплантатов. Среди развившейся фиброзной ткани в последний наблюдаемый нами срок (21 сутки) удается отметить только отдельные сохранившиеся, но сильно измененные эпителиальные клетки со светлыми ядрами и резко оксифильной цитоплазмой.

Во всех случаях эпителий печени и желчных протоков образовывал однослойные трубки и тяжи. Эпителизации кусочков целлоидина и некротических масс в наших опытах не происходило. Его превращения в мезенхимные элементы, также как и образования многослойных структур, характерных для тканей эпидермального типа, не наблюдалось. Во всех этих отношениях наши данные подтверждают результаты исследования не только О. П. Ржевуцкой, но и А. В. Зубаревой, изучавшей рост эпителия печени молодых кроликов в условиях тканевых культур (1949).

Выводы

1. В условиях роста в имплантатах по методу Ф. М. Лазаренко необлученные и облученные ткани печени полностью сохраняют присущие им гистиотипические свойства.

2. После общего рентгеновского облучения в дозе 2000 *p* клетки печени сохраняют способность к пролиферации. Пролиферация печеночных клеток путем митотического деления в условиях имплантации в первые сутки после облучения затормаживается, а в дальнейшем приходит к норме.

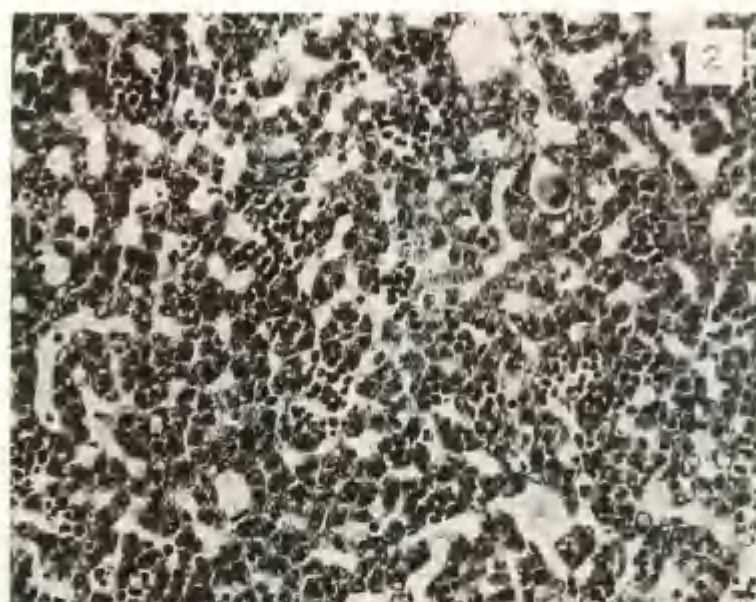
3. Клетки желчных протоков более радиорезистентны по сравнению с эпителием печени.

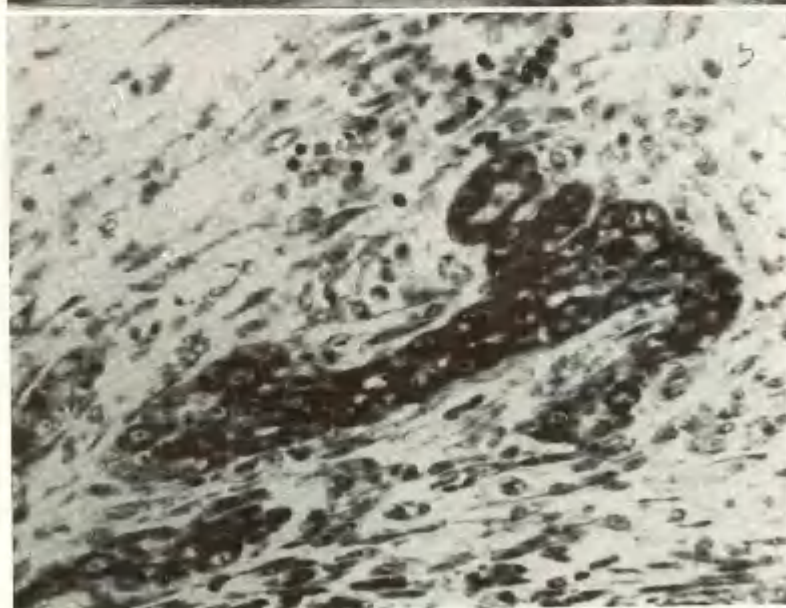
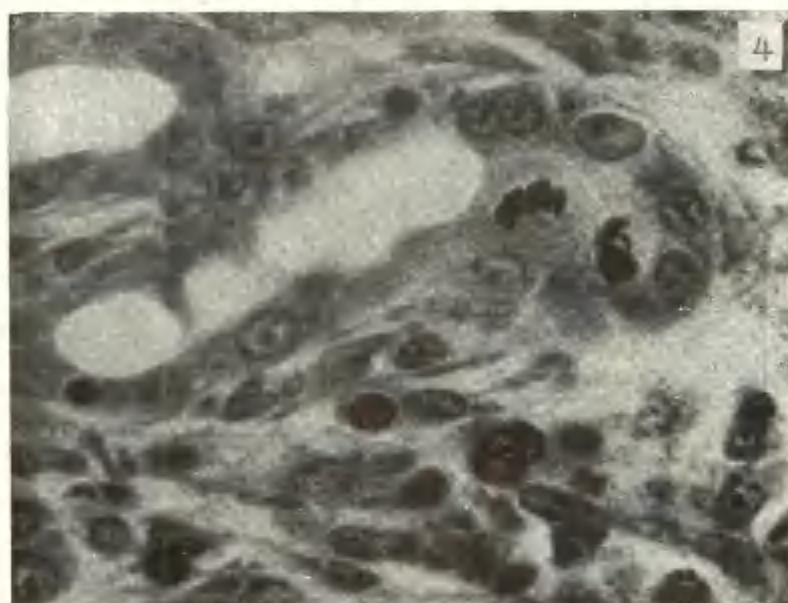
Рис. 2. Участок печени новорожденного крысенка. Дольчатое строение выражено плохо. Кровеносные капилляры с широким просветом. Видны очаги миелоидного кроветворения. Гемалаун-эозин, об. 40, гомаль VI.

Рис. 3. Участок двухсуточного облученного имплантата, состоящий из группы печеночных клеток (а) и расширенный желчный капилляр на полутангенциальном срезе (б). Митоз в одной из эпителиальных клеток. Гемалаун-эозин. Об. 90, гомаль VI.

Рис. 4. Участок пятисуточного облученного имплантата. Патологические митозы и двуядерная клетка в новообразованной эпителиальной трубочке. Азур II-эозин. Об. 90, гомаль VI.

Рис. 5. Пятисуточный облученный имплантат. Вростание в соединительную ткань новообразованного эпителиального тяжа. Азур II-эозин. Об. 40 X, ок. 10.





ЛИТЕРАТУРА

Зубарева А. В. Экспериментально-гистологическое исследование над эпителиальными элементами печени. Вопросы онкологии, 1949, 1, 1, 221—228. — Лазаренко Ф. М. Опыты культивирования тканей и органов в организме. I. Общее введение. Методика. Арх. анат., 1939, 21, 1, 45—52; Закономерности роста и превращения тканей и органов в условиях культивирования их в организме. М., Медгиз, 1959. — Максимов А. А. Über entzündliche Bindegewebsneubildung bei der weißen Ratte und die dabei auftretenden Veränderungen der Mastzellen und Fettzellen. Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie, 1904, 25, 93—126; Studies on the changes produced by Roentgen rays in inflamed connective tissue. J. Exper. Med., 1923, 37, 3, 319—340. — Ржевущкая О. П. О микроскопическом строении печени крупного рогатого скота и регенерации эпителиальных элементов печени в экспериментальных условиях. Автореф. дис., Чкалов, 1938; Экспериментальные исследования камбиальных элементов печени. Тр. Чкаловск. с.-х. ин-та, 1941, 1, 1, 155. — Стрелин Г. С. и Шиффер И. В. Влияние ионизирующего излучения на регенерацию печени белых мышей при кратковременном и хроническом облучении животных. Бюлл. exper. биол. 1963, 7, 87—91. — Ясвоин Г. В. Экспериментальные исследования над действием рентгеновых лучей на соединительную ткань. Вестн. рентгенол. и радиол., 1932, 11, 45—53.

Ariel J. M. The effect of single, massive doses of Roentgen radiation upon the liver. Radiology, 1951, 57, 561—573. — Bloom W. a. Bloom M. B. кн.: "Radiation biology", New York, 1954, p. 367 — Ellinger F. Response of the liver to irradiation. Radiology, 1945, 44, 241—254. — North N. a. Nims L. F. Time-dose study of biochemical responses of rats to X-radiation. Federation Proc., 1949, 8, 119—120. — Pohle E. a. Bunting C. H. Studies of the effect of roentgen rays on the liver. Histological changes on liver of rats following exposure to single graded doses of filtered roentgen rays. Acta Radiol., 1932, 13, 117—124. — Rhoades R. P. Structures accessory to the gastrointestinal tract. В кн.: "Histopathology of irradiation from external and internal sources," New York, 1948, p. 541 — Seldin M. Über die Wirkung der Röntgen- und Radiumstrahlen auf innere Organe und den Gesamtorganismus der Tiere. Fortschr. Gebiete Röntgenstrahlen, 1904, 7, 322—339.

PROLIFERATION OF IRRADIATED HEPATIC CELLS IMPLANTED INTO THE FOCUS ASEPTIC INFLAMMATION

V. I. Bulgak

Summary

The irradiated as well non-irradiated rat hepatic tissue implanted after the Lazarenko method maintains its histiotypic properties and proliferative capacity, even after single exposure of the donor animal to X-rays in doses of 200 r.

However, in case of irradiation there appears a depression of mitotic activity during the first twenty-four hours. The cells of biliary ducts are more radioresistant than the hepatic epithelium.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В ТКАНЯХ ПОДЖЕЛУДОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ПЕЧЕНИ В ПРЕДИАБЕТИЧЕСКОМ СОСТОЯНИИ

Г. Н. Воронин, З. П. Касумова-Михальская

Отдел общей физиологии им. акад. К. М. Быкова и лаборатория экспериментальной гистологии Института экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

В последнее время эндокринологи и терапевты все больше внимания уделяют так называемым предиабетическим состояниям (С. Г. Генес, 1963; Н. М. Дразнин, 1963; И. М. Нейман, 1964 и др.). В эксперименте это состояние может быть вызвано малыми или «субдиабетогенными» дозами аллоксана (5 мг на 100 г веса), т. е. в 4—6 раз меньшими, чем общепринятые «диабетогенные» (Х. Хьюгс и Г. Хьюгс — Н. Hughes and G. E. Hughes, 1944; Х. Хьюгс, 1947, Дафф — Duff, 1948). При этом в поджелудочной железе обнаруживаются единичные дегенеративно измененные β -клетки и одновременно новообразованные островки Лангерганса (Н. А. Наумова, 1961; Л. И. Кулешова, 1964).

Настоящая работа проведена на 170 белых крысах (самцах) весом 296—378 г, которые содержались в одинаковых условиях пищевого режима. 101 животному длительное время ежедневно подкожно вводился аллоксан по 5 мг/100 г веса. Последний 69 крысам (контрольным) не инъецировался. Уровень сахара крови у больных животных в большинстве случаев увеличивался в 1,5—2 раза сравнительно с его состоянием до опыта. Ввиду того, что у крыс, находящихся в предиабетическом состоянии, отмечался незначительный подъем сахара в крови, нами были проведены у большинства этих животных специальные пробы с двойной нагрузкой по методу Экстон и Роз (см. таблицу 1). Из таблицы видно, что несмотря на то, что исходный уровень сахара крови (графа 3) у двух больных крыс незначительно превышал содержание сахара у здоровых животных, у них после первой нагрузки глюкозой гипергликемия значительно увеличилась (графа 4). Через 30 минут после второй нагрузки или спустя 60 минут после первой у больных крыс

Таблица 1

Уровень сахара крови у крыс (в мг%) после двойной нагрузки глюкозой по методу ЭКСТОН и РОЗ

№№ пп	Крысы	Содержание сахара до нагрузки	Содержание сахара после нагрузки		
			30 минут	60 минут	120 минут
1	2	3	4	5	6
1	Больная	141	205	270	152
2	Больная	95	160	253	128
3	Больная	110	175	175	175
4	Здоровая	97	108	110	107
5	Здоровая	101	118	125	98

сахар крови еще больше повышался по сравнению с контролем (графа 5) и через 2 часа (графа 6) не приходил к исходному уровню (графа 3). Эти наблюдения позволяют нам сделать заключение о том, что малые дозы аллоксана при длительном введении действительно вызывают у взрослых крыс предиабетическое состояние.

72 животным подкожно вводились радиоактивные индикаторы (метионин меченый по сере и хлористый цинк из расчета 1 $\mu\text{с/г}$). Больным крысам изотопы инъецировались через 1 сутки после прекращения введения аллоксана. После введения метионина больные и здоровые животные забивались через 4, 24, 48 часов, а после введения цинка через 2, 4, 24 часа. На каждый срок взято по 12 крыс вместе с контролем. Кусочки поджелудочной железы и печени от всех этих животных фиксировались в жидкости Карнуа и Буэна. Парафиновые срезы окрашивались помимо обычных гистологических методик по Гомори для выявления β - и α -клеток. Следовые и контрастные автографы изготавливались с помощью жидкой эмульсии типа «Р», выпускаемой НИКФИ (Г. С. Лыкова, Э. И. Щербань, Л. В. Фунштейн, 1957). Количественный учет треков метионина и цинка, позволяющий судить о степени интенсивности включения изотопа в ткани, производился путем подсчета на следовых автографах в 100 квадратах сетки окулярмикрометра (1 квадрат равен 50 μ^2).

Постановка этих опытов предусматривала изучение методом гистоавторадиографии общего белкового обмена и обмена цинка в эпителии поджелудочной железы и печени у крыс в предиабетическом состоянии. Цинк как индикатор был применен в связи с имеющимися в литературе указаниями, что он принимает участие в регуляции окислительно-восстановительных процессов в клетке и является компонентом карбоангидразы и ингибитором

инсулиназы (А. О. Войнар, 1960; Ф. Хох и Б. Валли, 1962).

У крыс после инъекции аллоксана в печени морфологических изменений не было обнаружено, тогда как в крупных островках поджелудочной железы в разном количестве встречались дегенерирующие β -клетки (рис. 1). Гистологических изменений в α -клетках не отмечалось. Однако при этом изменялось соотношение β - и α -клеток. У здоровых животных это соотношение составляет 10:1, тогда как у больных оно изменяется до 3:1. У последних животных количество β -клеток с 91% уменьшалось до 72%, а α -клеток увеличивалось с 9% до 28%. Образование α -клеток происходило за счет размножения клеток вставочных отделов и мелких выводных протоков. Единичные митозы наблюдались в β -клетках островков Лангерганса (рис. 2).

Нами (Г. Н. Воронин, 1959, 1960а, 1960б) было установлено, что радиоактивная сера метионина уже через 30 минут после подкожного введения здоровым крысам в значительном количестве обнаруживается в эпителии поджелудочной железы и печени. Максимум включения ее приходится на 2 часа, через 4 часа начинается выведение изотопа. Морфологических же исследований, относящихся к изучению динамики включения серы метионина в эти железы при аллоксановом диабете, в литературе не имеется.

Наши исследования позволили выявить существенную разницу в интенсивности включения S^{35} -метионина в поджелудочной железе и печени у здоровых и больных крыс (см. таблицу 2). На этой таблице видно, что через 4 часа после введения

Таблица 2

Включение S^{35} -метионина в эпителий поджелудочной железы и печени (на $50 \mu^2$) у здоровых и больных крыс (средние данные)

Время нахождения S^{35} в организме (часы)	Здоровые крысы			Больные крысы		
	Печень	Поджелудочная железа		Печень	Поджелудочная железа	
		Ацинусы	Островки Лангерганса		Ацинусы	Островки Лангерганса
4	$1,75 \pm 0,06$	$1,62 \pm 0,09$	$0,83 \pm 0,07$	$0,75 \pm 0,06$	$1,13 \pm 0,07$	$0,55 \pm 0,05$
24	$0,82 \pm 0,06$	$0,64 \pm 0,06$	$0,49 \pm 0,06$	$0,48 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,05$	$0,45 \pm 0,05$
48	$0,86 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,05$	$0,43 \pm 0,04$	$0,48 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,05$	$0,39 \pm 0,05$

радиоактивной метки заметной разницы в интенсивности включения серы метионина в клетках ацинусов и печени у контрольных животных нет, тогда как в клетках островков Лангерганса количество ее значительно меньше, чем в эпителии ацинусов и печени. Такая же, но менее выраженная картина наблюдается в этих железах и через 24 часа. Спустя 48 часов радиоактивная сера метионина больше всего обнаруживается в клетках печени.

У крыс в предиабетическом состоянии, в противоположность здоровым, через 4 часа S^{35} -метионина в клетках печени, ацинусов и островков значительно меньше, чем у здоровых, и эта разница особенно выражена в печени (см. таблицу 2). Если цифровые данные включения серы метионина контрольных животных принять за 100%, то интенсивность ее у больных составит в печени 43%, в островках 66% и в ацинусах 70%. В этом можно также убедиться и при сопоставлении между собой соответствующих этому сроку как следовых, так и контрастных автографов (рис. 3 А—Б). Это количественное соотношение сохраняется в эпителии поджелудочной железы и печени еще и через 24 часа. Через 48 часов некоторую разницу включения S^{35} -метионина можно наблюдать только в клетках печени и островков Лангерганса.

Более резкое снижение включения метионина, меченого по сере, после введения крысам больших доз аллоксана в печени биохимическими методами установили В. С. Ильин и В. Ф. Трюфанов (1960, 1961); в поджелудочной железе Рассэл — Russel (1955). По данным В. С. Ильина и В. Ф. Трюфанова снижение включения S^{35} -метионина в печени обусловлено нарушением энергетического обеспечения синтеза белка вследствие блока глюकोкиназной реакции.

Наши вышеприведенные данные, полученные с помощью метода авторадииграфии, подтверждают результаты ранее нами проведенных гистохимических исследований, показавших снижение содержания РНК в клетках поджелудочной железы и печени крыс в процессе развития аллоксанового диабета (Г. Н. Воронин, З. П. Михальская, А. В. Риккль, 1962).

У здоровых животных цинк в большом количестве находится в клетках островков Лангерганса (А. О. Войнар, 1960; Ф. Хох и Б. Валли, 1962; И. А. Шевчук, 1964а и др.).

Работ, касающихся динамики включения радиоактивного цинка ($Zn^{65}Cl_2$) в поджелудочную железу и печень взрослых крыс после длительного введения малых доз аллоксана, в доступной нам литературе не встретилось. По данные И. А. Шевчука (1964б) малые дозы аллоксана (10 мг/кг) при однократном введении в поджелудочной железе вызывают увеличение включения цинка, тогда как большие дозы (40 мг/100 г) снижают его содержание.

Наши исследования показали, что Zn^{65} через 2 часа после

Таблица 3

Выделение радиоактивного цинка (Zn^{65}) в эпителий поджелудочной железы и печени (на $50 \mu^2$) у здоровых и больных крыс (средние данные)

Время нахо- ждения Zn^{65} в организме (часы)	Здоровые крысы				Больные крысы			
	Печень	Поджелудочная железа			Печень	Поджелудочная железа		
		Островки Лангерганса	Ацинусы вблизи островков	Ацинусы пидали от островков		Островки Лангерганса	Ацинусы вблизи островков	Ацинусы вдали от островков
2	—	—	—	—	—	—	—	—
4	3.45 ± 0.12	3.56 ± 0.15	3.92 ± 0.31	3.49 ± 0.15	1.66 ± 0.06	2.05 ± 0.08	2.13 ± 0.08	2.10 ± 0.08
24	2.89 ± 0.12	3.36 ± 0.14	2.33 ± 0.11	2.68 ± 0.12	1.35 ± 0.07	1.72 ± 0.10	1.75 ± 0.11	1.76 ± 0.10

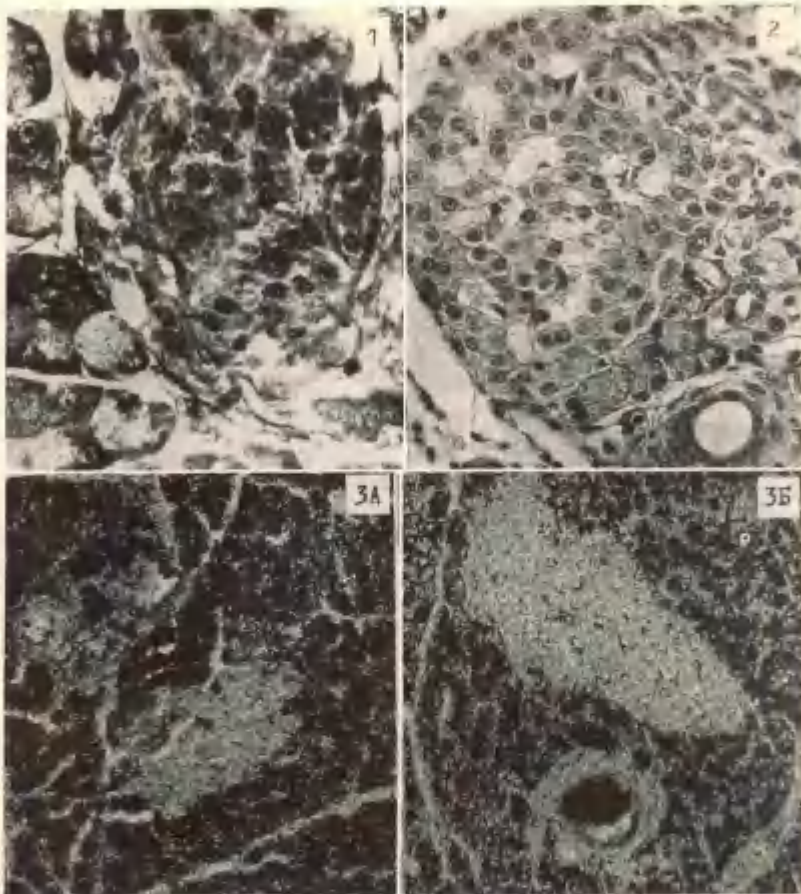
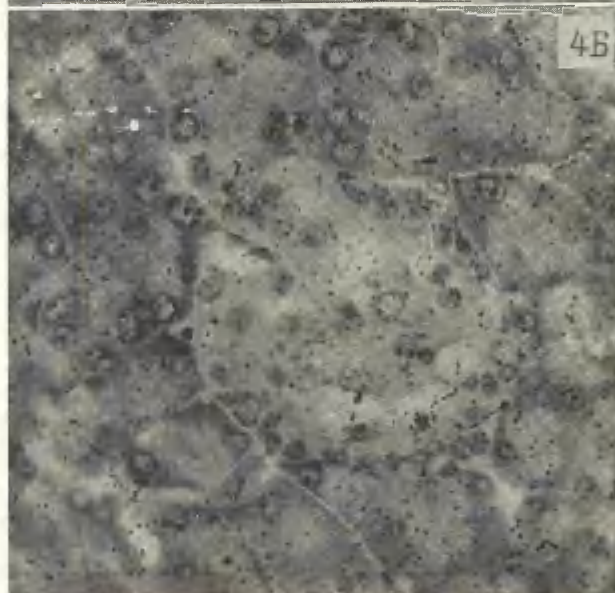
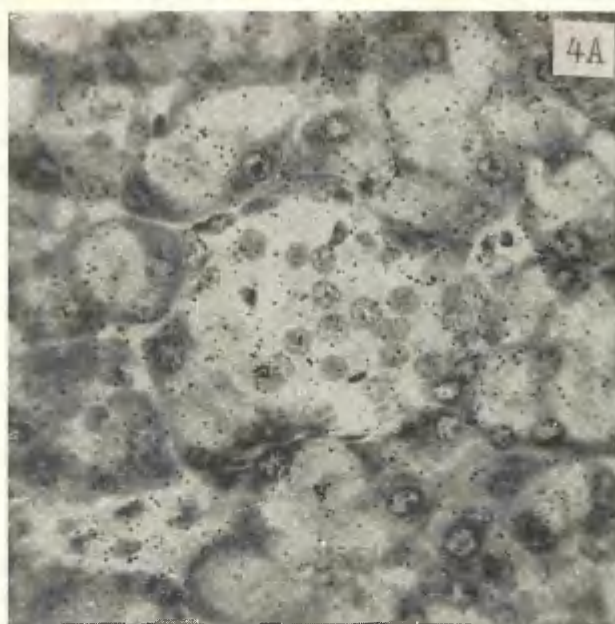


Рис. 1. Поджелудочная железа больной белой крысы. Содержание сахара в крови 141 мг%. Дегенерирующие β — клетки в островке Лангерганса. Буэн. Гомори. Увелич. 720 х.

Рис. 2. Поджелудочная железа больной белой крысы. Содержание сахара в крови 110 мг%. Митоз β — клетки в островке Лангерганса. Буэн. Гомори. Увелич. 480 х.

Рис. 3. Контрастные автографы поджелудочной железы здоровой (А) и больной белой крысы (Б). Содержание сахара в крови у здоровой крысы 97 мг%, у больной 141 мг%. 4 часа после введения S^{35} -метионина. Экспозиция проявления 30 суток. А — Более интенсивное включение S^{35} в ацинусах, менее интенсивное в островке Лангерганса. Б — Снижение включения S^{35} -метионина в ацинусах и островке Лангерганса. В выводном протоке находится радиоактивная сера. Буэн. Увелич. 130 х.



введения как у контрольных, так и у больных животных в клетках поджелудочной железы и печени не обнаруживается. Через 4 часа в печени крыс, страдающих предиабетическим состоянием, цинк составляет 48%, в β -клетках островков 57%, в клетках ацинусов «периинсулярной» зоны 66% и в ацинусах вдали от островков 63% по сравнению с контролем (см. таблицу № 3). Через 24 часа в эпителии этих желез отмечается некоторое падение содержания цинка. Таким образом, обмен радиоактивного цинка больше всего нарушается в печеночных клетках, затем в β -клетках островков поджелудочной железы (рис. 4 А—Б) и меньше всего в клетках ацинусов. Наблюдаемое И. А. Шевчуком (1964б) некоторое повышение, а не снижение интенсивности включения цинка в поджелудочной железе следует объяснить тем, что он применил другой метод определения содержания этого элемента (полярографический) и вводил крысам однократно очень маленькую дозу аллоксана.

Данные нашей работы показывают, что при длительном применении малых доз аллоксана в поджелудочной железе крыс происходит гибель β -клеток в некоторых крупных островках Лангерганса и наблюдается в них изменение соотношения β - и α -клеток. Это нашло свое отображение в умеренно выраженной гипергликемии у животных. Кроме того, использование в настоящем исследовании метода автордиографии позволило нам выявить и нарушение общего белкового обмена и обмена цинка в поджелудочной железе и печени. Наряду с деструктивными изменениями в эпителии поджелудочной железы были выявлены и реактивные процессы, например, митотическое деление β -клеток, ацинозных клеток и клеток, выстилающих вставочные отделы, а также превращение отдельных ацинозных клеток «периинсулярной» зоны в островковые. Использование модели предиабетического состояния позволяет глубже подойти к пониманию не только морфологических изменений в тканях поджелудочной железы, но и процесса ее физиологической регенерации.

Рис. 4. Следовые автографы поджелудочной железы здоровой (А) и больной белой крысы (Б). Содержание сахара в крови у здоровой крысы 99 мг%, у больной 121 мг%. 4 часа после введения $Zn^{65}Cl_2$. Экспозиция проявления 7 суток. А — Несколько большее включение Zn^{65} в клетках островка Лангерганса, чем в ацинозных клетках. Отчетливо выраженная базофилия ацинозных клеток. Б — Снижение включения Zn^{65} в клетки островка Лангерганса и ацинусов; в последних цинка несколько больше, чем в островковых клетках. Умеренное падение базофилии в цитоплазме ацинозных клеток. Буэн. Азур II-эозин. Увелич. 490 х.

ЛИТЕРАТУРА

Война́р А. О. Биологическая роль микроэлементов в организме животных и человека. Изд. «Высшая школа», М., 1960, 311—315. — Ворони́н Г. Н. Гистологическое изучение экзокриновой секреции поджелудочной железы методом автордиографии. В кн.: Радиоактивные индикаторы в гистологии. Изд. ИЭМ АМН СССР, Л., 1959, 179—188; Сравнительное изучение динамики включения радиосеры в белковые и слизистые железы. Ежегодник ИЭМ АМН СССР за 1959 год, Л., 1960-а, 522—528; Изучение динамики включения S^{35} меркамина, S^{35} сульфата натрия и S^{35} метионина в белковые и слизистые железы. Докл. АН СССР, 1960-б, 131, 2, 425—428. — Воронин Г. Н., Михальская З. П., Риккль А. В. О морфологических изменениях поджелудочной железы в процессе развития экспериментального диабета. Бюлл. exper. биол., 1962, 12, 103—105. — Генес С. Г. Сахарный диабет. Медгиз, М., 1963. Дразнин Н. М. В кн.: Основы эндокринологии. Изд. АН БССР, Минск, 1963, 268—310. — Ильин В. С. и Трюфанов В. Ф. Включение S^{35} -метионина в белки печени крыс с аллоксановым диабетом в условиях блока и «обхода» глюкокиназной реакции. Вopr. мед. химии, 1960, 6, 4, 386—389; Включение метионина- S^{35} в белки срезов печени крыс с аллоксановым диабетом в среде, содержащей глюкозу или фруктозу. Вopr. мед. химии, 1961, 7, 1, 82—85. — Кулешова Л. Н. Влияние малых доз аллоксана на регенерацию островковой ткани поджелудочной железы. Бюлл. exper. биол., 1964, 3, 109—112. — Лыкова Г. С., Щербань Э. И., Фунштейн Л. В. Пособие по гистоавтордиографии, Л., 1957. — Наумова Н. А. Стимуляция инсулярной ткани поджелудочной железы малыми дозами аллоксана. Пробл. эндокринол. и гормонотер., 1961, 7, 1, 53—56. — Нейман И. М. Физиология и патофизиология желез внутренней секреции. Изд. «Медицина», М., 1964. — Хох Ф. и Валии Б. Роль цинка в обмене веществ. В кн.: Микроэлементы. Изд. иностр. литер., М., 1962, 435—470. — Шевчук И. А. Зависимость содержания и распределения цинка в поджелудочной железе человека от возрастных изменений островкового аппарата. Арх. анат., 1965а, т. XLVI, 5, 83—87; Изменение содержания и распределения цинка в поджелудочной железе под влиянием аллоксана и инсулина. Пробл. эндокринол. и гормонотер., 1964б, 2, 103—106.

Duff G. L. Patology of pancreas in experimental diabetes mellitus. Am. J. Med. Sci., 1945, 210, 381—397. — Hughes H. and Hughes G. E. Effects of prolonged administration of small doses of alloxan upon islet tissue the rat pancreas. Brit. J. Exp. Path., 1944, 25, 126—130. — Hughes H. Cyclical changes in the islets of Langerhans in the rat pancreas. J. of Anat., 1947, 81, 1, 82—92. — Russel J. A. Hormonal control of amino acid metabolites. Federa. Proc., 1955, 14, 3, 696—705.

Morphologic changes in the pancreas and the liver in a prediabetic state

G. N. Voronin, Z. P. Kasumova-Mikhalskaya

Summary

A prolonged administration of alloxane (0,5 mg/100 g per day) in rats is followed by elevation of the blood sugar level by 1 to 1,5 times and by increase of α/β -cell ratio from 1 : 10 to 1 : 3. However, in prediabetic rats there is mitotic division of β -cells, as well as acinar and intercalary ones. Transformation of cells of the «periinsular zone» into the insular cells may be seen. S^{35} and Zn^{65} metabolism rate, as studied radioautographically in the pancreas and the liver, has decreased, but no morphological changes can be seen in the latter.

РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ТКАНЕЙ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ У ОВАРИЭКТОМИРОВАННЫХ ЖИВОТНЫХ

Е. Н. Никифорова

Лаборатория экспериментальной гистологии Института экспериментальной медицины АМН СССР. Ленинград

Изменения молочной железы при репаративной регенерации изучались рядом авторов (Коен /Coep/, 1887; П. В. Власов, 1909; Д. И. Головин, 1956; И. В. Маркелова, 1962). Каких-либо данных о репаративной регенерации тканей молочной железы у овариэктомированных животных в доступной литературе мы не нашли.

Процесс репаративной регенерации изучался нами у 116 рожающих белых крыс на 4-ой правой (брюшно-паховой по Тернеру /Turner, 1934/) молочной железе. Термическое повреждение железы производилось через кожу раскаленной металлической пластинкой, неправильной формы, на глубину 4 мм. В тканях железы после этого образовывался дефект размерами 2×2 —4 мм. В I серии опытов (72 крысы) повреждение производилось через 20 или 50 суток после двусторонней овариэктомии, во II — «контрольной» (44 крысы) — у нормальных животных. Крысы забивались после повреждения в одно и то же время дня (от 10 до 11 часов) через 1, 3, 5, 7, 10, 15, 20, 30, 40 и 60 суток после ожога. Кроме того были взяты для изучения морфологии молочной железы 5 овариэктомированных и 5 контрольных животных.

Молочные железы фиксировались в жидкостях Карнуа, Бранка и Ценкер-формоле. Парафиновые срезы толщиной 5—7 микрон окрашивались гемалауном-эозином, гематоксилином Гейденгайна и Ясвоина, азур II-эозином, по Маллори и Блохману. Кислые мукополисахариды выявлялись по методу Гале в модификации Моури (Mowry, 1958). Нуклеиновые кислоты выявлялись по Фельгену и Браше. У всех крыс определялась стадия эстрального цикла по картине клеток на влажных мазках. Кроме того из грудных молочных желез, имеющих уплощенную форму, были приготовлены фиксированные в форма-

лине и окрашенные гемалауном тотальные препараты, дающие возможность определить физиологическое состояние животного и стадию эстрального цикла (Коль /Cole/, 1933; М. Р. Богданова, 1938; Дальтон /Dalton/, 1945 и др.). Все овариэктомированные крысы и 35 из 44 нормальных находились в стадии диэструса. Подсчет митозов от каждого животного производился на 6000 клеток, как в эпителии, так и в соединительной ткани с последующим вычислением митотического коэффициента (МК). Полученные результаты обрабатывались статистически по методу Фишера-Стьюдента.

Через сутки на месте повреждения в молочной железе в I и II сериях опытов отчетливо выражена зона некроза. В окружающих тканях имеются небольшие кровоизлияния, кровеносные сосуды расширены, лейкоциты в них занимают краевое расположение. Наряду с этим обнаруживаются многочисленные лейкоциты и лимфоциты вокруг места повреждения. Уже на этой стадии заметны реактивные изменения в эпителиальных клетках железистых долек вблизи места повреждения. Их размеры увеличиваются, цитоплазма приобретает более базофильный характер.

Через 3 суток в обеих сериях опытов вокруг зоны некроза в большом количестве концентрируются лейкоциты, лимфоциты и макрофаги, фагоцитирующие некротические массы. Начинается дедифференцировка эпителиальных клеток в системе секреторных отделов и выводных протоков. При этом увеличиваются размеры клеток вблизи места повреждения. Миепителиальные клетки, округляясь, становятся сходными с секреторными: различить их можно уже не по форме, а по месту расположения. Количество митозов в эпителиальных клетках молочных желез после овариэктомии, как известно, уменьшается (С. С. Лагучев, 1959). По нашим подсчетам МК через 20 суток после овариэктомии снижается с 0,5 до 0,1 (табл. 1). Через 3 суток МК эпителиальных клеток в обеих сериях опытов достигает 0,7. Необходимо, однако, подчеркнуть, что количество митотически делящихся клеток при этом увеличивается у нормальных животных в 1,4, а у овариэктомированных — в 7 раз. Иными словами, после повреждения железы подъем митотической активности эпителиальных клеток у овариэктомированных крыс выше, чем у нормальных. В клетках грануляционной ткани через 3 суток различия в МК тоже нет: в обеих сериях опытов он с 0,2 увеличивается до 2,3, то есть более чем в 11 раз (табл. 1)*. Располагается в это время подавляющее число митотически делящихся клеток вблизи места повреждения.

* Такая же таблица, однако вычисленная на меньшем числе крыс, в сроки до 15 суток после ожога железы, напечатана в предыдущей работе (1963). Полученные цифры на большом числе крыс принципиально таковы же.

Таблица 1

Изменения митотического коэффициента клеток тканей молочной железы при репаративной ее регенерации у нормальных и овариэктомированных крыс

	Сроки после нанесения травмы в сутках	Нормальные				Овариэктомированные			
		Эпителий		Соединительная ткань		Количество животных	Эпителий		Соединительная ткань
		Среднее количество митозов на 6000 клеток	МК	Среднее количество митозов на 6000 клеток	МК		Среднее количество митозов на 6000 клеток	МК	
Контрольные	5	$3,0 \pm 0,3$	0,5	$1,2 \pm 0,06$	0,2	5	$0,5 \pm 0,3$	0,1	$1,5 \pm 0,3$
	3	$2,3 \pm 0,72$	0,4	$1,7 \pm 0,22$	0,3	5	$0,5 \pm 0,3$	0,1	$1,5 \pm 0,3$
	3	$0,4 > p > 0,3$		$0,1 > p > 0,05$			$p = 1,0$		$p = 1,0$
	3	$4,0 \pm 0,57$	0,7	$13,9 \pm 3,0$	2,3	4	$4,0 \pm 0,9$	0,7	$14,0 \pm 2,0$
	3	$0,2 > p > 0,1$		$p < 0,01$		4	$p < 0,01$		$p < 0,01$
Подопытные	5	$8,6 \pm 1,1$	1,4	$21,3 \pm 1,6$	3,5	4	$5,8 \pm 0,8$	3,5	$17,3 \pm 1,6$
	6	$p < 0,01$	2,8	$p < 0,01$	4,4	5	$10,6 \pm 0,5$	1,8	$p < 0,01$
	7	$16,8 \pm 1,4$		$26,5 \pm 2,0$			$p < 0,01$		$26,0 \pm 1,0$
	10	$p < 0,01$	1,9	$p < 0,01$	2,7	4	$7,5 \pm 1,0$	1,2	$p < 0,01$
	15	$17,5 \pm 0,9$		$16,2 \pm 1,1$		4	$p < 0,01$		$14,5 \pm 0,3$
	15	$p < 0,01$	0,2	$p < 0,01$	0,2	4	$p < 0,01$	0,2	$p < 0,01$
	20	$1,5 \pm 0,64$		$1,2 \pm 0,52$			$1,0 \pm 0,4$		$1,5 \pm 0,3$
		$0,1 > p > 0,05$		$p = 1,0$	0,2	4	$p = 0,3$		$p = 1,0$
		$1,5 \pm 0,5$	0,2	$1,2 \pm 0,1$	0,2	4	$0,75 \pm 0,5$	0,1	$0,75 \pm 0,5$
		$p = 0,05$		$p = 1,0$			$0,7 > p > 0,6$		$0,3 > p > 0,2$

Через 5 суток в обеих сериях опытов количество митотически-делящихся эпителиальных клеток увеличивается еще более, достигая максимума через 7 суток. В эти сроки отмечаются различия в интенсивности митотического деления между животными двух серий опытов (табл. 1). МК у овариэктомированных крыс через 5—7 суток составляет около 60% по отношению к животным контрольным. Как видно на рисунке 1, различия эти близки к достоверному. МК клеток грануляционной ткани в обеих сериях опытов в эти сроки практически одинаковые: различия между ними недостоверные (рис. 1). Необходимо отметить, что в эти сроки большое количество митозов обнаруживается в эпителиальных клетках вдали от места повреждения. МК в эпителии у овариэктомированных крыс через 10 суток также ниже, чем у контрольных, однако различие это, как видно на рисунке 1, недостоверное.

Через 15 суток МК в обеих сериях опытов одинаковые, но превышают у овариэктомированных крыс исходные числа в 2 раза.

Через 20 суток МК в обеих сериях опытов приближается к исходному. В грануляционной ткани митотическое деление клеток в обеих сериях опытов в эти сроки протекает одинаково.

В результате пролиферации эпителиальных и миоэпителиальных клеток через 5 суток образуются эпителиальные трубочки, которые начинают расти в грануляционную ткань у места повреждения. В это время грануляционная ткань еще содержит большое количество лейкоцитов. Поэтому на этой стадии трудно сказать, представляют ли разрастания эпителия проявление регенераторного процесса. Возможно, что часть их связана с процессом воспаления и должна быть поэтому отнесена к разрастаниям воспалительного характера. Однако через 7—10 суток у подавляющей массы животных зона повреждения заполнена грануляционной тканью, не содержащей большого количества лейкоцитов. Поэтому разрастающиеся в ней железистые трубочки в месте повреждения несомненно должны рассматриваться как регенераторные процессы. Стенка вновь образованных эпителиальных трубочек местами представлена одним слоем кубических клеток, чаще однако она образована двумя-тремя слоями (рис. 2). Естественно, что просвет трубочек выражен не всегда хорошо. В тех случаях, когда срез проходит тангенциально, он вообще не виден (рис. 3—4).

В нормальных условиях железистые концевые отделы молочной железы содержат большое количество кислых мукополисахаридов, которые содержатся не только в просвете концевых отделов и протоков, но и в апикальной части цитоплазмы эпителиальных клеток. Во вновь образованных эпителиальных трубочках кислые мукополисахариды, как правило, выявляются в виде мелкой зернистости во всей цитоплазме клеток. Эти разли-

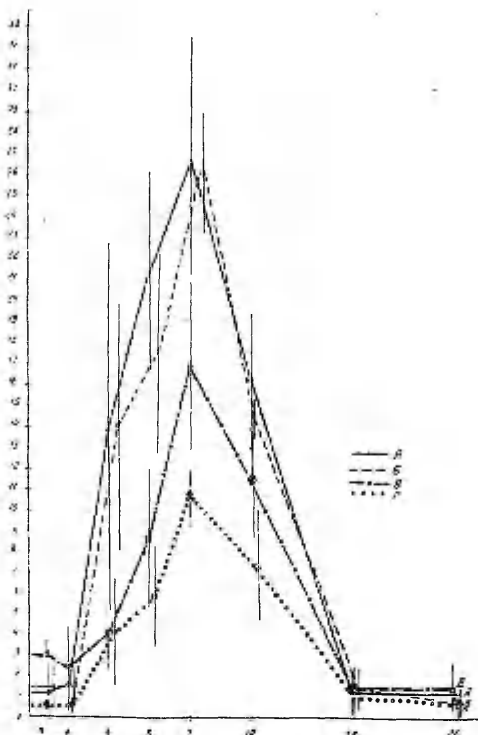


Рис. 1. Изменение митотической активности тканей молочной железы при репаративной регенерации у нормальных и овариэктомированных крыс. По оси абсцисс — сроки после нанесения ожога в сутках, по оси ординат — среднее количество митозов на 6000 клеток. А — соединительная ткань. В — эпителий — у нормальных крыс. Б — соединительная ткань. Г — эпителий у овариэктомированных крыс.

чия, по-видимому, отражают функциональное состояние эпителия, который в процессе регенерации становится менее дифференцированным.

Через 15—20 суток в обеих сериях опытов грануляционная ткань приобретает фиброзный характер. При этом увеличивается количество коллагеновых волокон. Количество фибробластов однако остается увеличенным по сравнению с количеством таковых в неповрежденных участках железы. Характер соединительной ткани является одним из показателей, по которому может быть обнаружено место повреждения через 30, 40 и 60 суток. После повреждения другим показателем являются остатки кровяных пигментов, хорошо выявляющиеся реакцией на берлин-

скую лазурь (по Перлсу) и реакцией на турнбулевую синь (по Тирману). В эти поздние сроки на месте повреждения обыкновенно обнаруживаются отдельные группы эпителиальных трубочек, окруженных фиброзной тканью. Кровеносные сосуды обычно в ней облитерированы. По-видимому, подавляющая часть новообразованных канальцев не вступает в связь с основными протоками железы. Однако после беременности и родов клетки этих трубочек выявляют способность к секреции в период лактации, как это показали специальные опыты, поставленные при выполнении другой работы.

ЛИТЕРАТУРА

Богданова М. Р. О взаимоотношении альвеол и ходов в молочной железе мыши. Архив анат., гистол. и эмбриол. 1938, 3, 434—445. — Власов В. П. О возрождении молочной железы и влиянии на нее фибролизина и йода. Дисс. докт., СПб., 1909. — Головин Д. И. Экспериментально-морфологическое исследование регенераторных разрастаний эпителия молочной железы. Труды Кишиневского мед. института, 1956, том V, 131—138. — Лагучев С. С. Влияние гормонов яичника на рост эпителия молочных желез. Бюлл. эксперим. биологии и медицины, 1959, 12, 103—108. — Маркелова И. В. Митотическая активность эпителия молочной железы мыши после удаления значительной массы ткани молочных желез. Бюлл. экспер., биологии и мед., 1962, в. 12; 84—89.

Coen E. Beiträge zur normalen und pathologischen Histologie der Milchdrüse. Ziegl. Beiträge 1887, 2, 83—100. — Cole H. A. The mammary gland of the mouse during the oestrus cycle, pregnancy and lactation. Proc. Roy. Soc., London, 1933, 114, 136—161. — Mowry R. W. Improved procedure for the staining of acidic polysaccharides by Müller's colloidal (hydrous) ferric oxyde and its combination with the Feulgen and the periodic acid Schiff reactions. Lab. Invest. 1958, 7, 566—576. — Dalton A. I. Histogenesis of the mammary gland of the mouse. В кн: A symposium on mammary tumors in mice. Washington, 1945, 22, 39-46. — Turner C. W. В кн: E. Allen. The mammary glands. Sex and internal Secretions. Baltimore, 1934, 544—583.

THE REPARATIVE REGENERATION OF TISSUES OF THE MAMMARY GLAND IN OVARYECTOMIZED ANIMALS

E. N. Nikiforova

Summary

A study of reparative regeneration of the mammary gland subjected to thermal injury in ovariectomized rats was made. In the sites of injury the terminal portions and ducts dedifferentiate and divide mitotically to form epithelial cords which invade the granulation tissue. At the same time mitoses occur throughout the gland. The main bulk of epithelial cords mentioned above do not connect with the duct system of the gland, but retain the capacity for secretion.

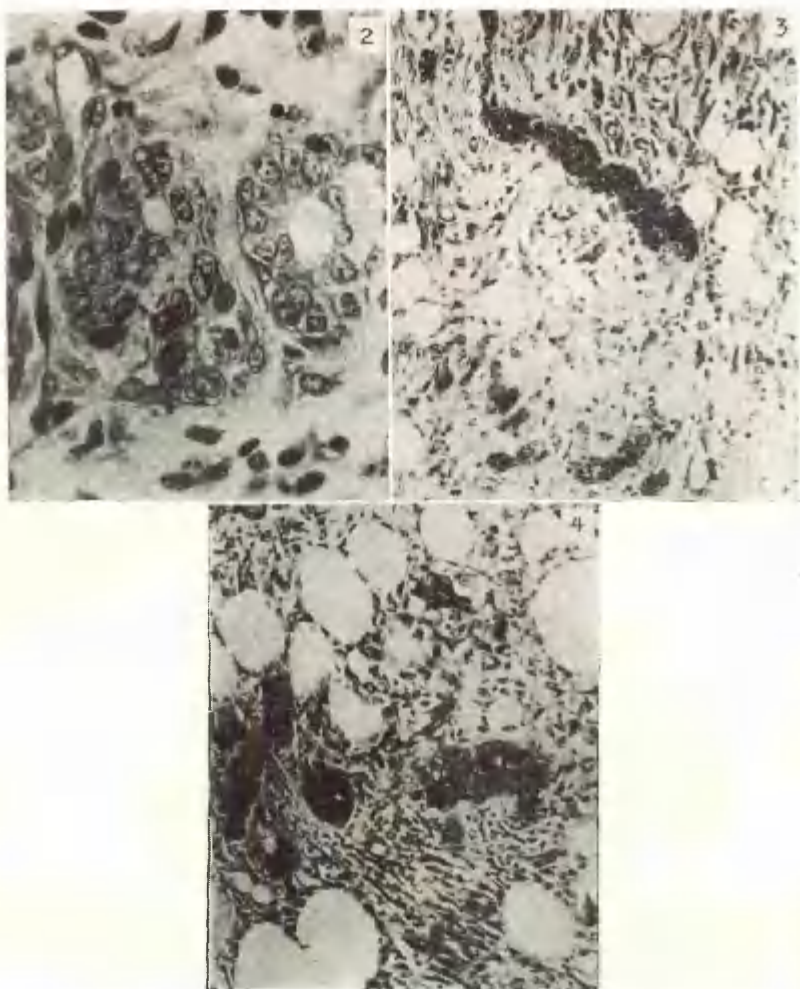


Рис. 2. Вновь образованные эпителиальные трубочки в грануляционной ткани около места термического повреждения. Молочная железа крысы через 27 суток после овариэктомии, через 7 суток после повреждения. Бранка. Гематоксилин Гейденгайна. Увелич. об. апохр. 90, ок. гомаль II (730 \times)

Рис. 3. Вновь образованные эпителиальные трубочки в грануляционной ткани молочной железы рожавшей крысы через 10 суток после термического ожога. Бранка. Азур II-эозин. Увел. об. апохр. 20, окуляр гомаль VI (270 \times).

Рис. 4. Вновь образованные эпителиальные трубочки в грануляционной ткани молочной железы рожавшей крысы через 30 суток после овариэктомии, 10 суток после нанесения ожога. Ценкер-формол. Азур II-эозин. Увел. об. апохр. 20, ок. гомаль VI (270 \times).

ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫЕ ПРОЦЕССЫ В МИОКАРДЕ ПРИ АДРЕНАЛИНОВОЙ МИОКАРДИОДИСТРОФИИ

С. Я. Марамаа

Кафедра факультетской терапии и Центральная медицинская научно-исследовательская лаборатория Тартуского государственного университета

Некрозы сердечной мышцы являются весьма частым проявлением самых различных патологических процессов. Некротическое поражение миокарда можно также вызвать экспериментально введением больших доз экстракта наперстянки (Левицки — Lewitzky, 1904), адреналина (Пирс — Pearce, 1906), витамина D (Сос и соавт. — Sos et al., 1960), протеолитических ферментов (Келлнер и Робертсон — Kellner a. Robertson, 1954) или гормонов коры надпочечников в сочетании с фосфатом натрия (Селье — Selye, 1958).

Вызванные различными причинами некрозы миокарда отличаются выраженным морфологическим сходством, и их можно считать стереотипной реакцией организма на разные поражающие факторы (Селье, 1961).

При заживлении некроза решающее значение имеет факт, что у взрослых индивидов возникшие в результате деструктивных процессов миокарда дефекты не заполняются новообразованием специфических клеточных элементов и восстановлением ранней тканевой структуры (Абрикосов А. И., 1947). Несмотря на уменьшение количества сократительных элементов миокарда, функция сердца нормализуется благодаря компенсаторной гипертрофии сохранившихся мышечных волокон (Линцбах — Linzbach, 1955).

Имеющиеся гистологические исследования об адреналиновой миокардиодистрофии касаются только возникающих в мышечных волокнах ранних дистрофических изменений до некроза и происходящей в этих очагах реакции грануляционной точки с образованием рубца (Данилова К. М., 1961; Корб и Тотович — Korb u. Totović, 1963). Значительно меньше данных имеется о гистологических изменениях в сохранившейся сердечной мышце. В предыдущей работе (Марамаа С. Я., 1963) мы отметили при адреналиновой миокардиодистрофии в прилегающих

к некротическим очагам мышечных волокнах увеличение количества РНК, а также повышение активности кислой фосфатазы.

Задачей настоящей работы было более подробно описать возникающие при этом морфологические показатели обмена нуклеиновых кислот в сохранившемся миокарде.

Подопытными животными использовали 25 крыс, у которых одно- или двухкратное подкожное введение адреналина в дозе 0,2—0,4 мг вызывает очаговые некрозы миокарда. Некрозы располагались главным образом в субэндокардиальной части левого желудочка и в папиллярных мышцах. Некротические изменения четко отмечаются через день после введения адреналина. Продукты распада фагоцитируются макрофагами, а вместе с тем разрастается незрелая соединительная ткань, активация которой происходит также между сердечно-мышечными волокнами вокруг некротических очагов. На рисунке 1 показано изменение сердечной мышцы через 48 часов после введения адреналина. В это же время активация соединительной ткани достигает максимума. По истечении 12—18 дней с начала опыта отмечались на месте более крупных некрозов соединительно-тканые рубчики. Если поражение захватывает отдельные мышечные волокна, то процесс протекает без соединительнотканной реакции.

В сохранившейся сердечной мышце, особенно в мышечных волокнах, прилегающих к некротическим очагам, развивались изменения, которые характеризовались утолщением мышечных волокон, набуханием ядер и усилением обмена рибонуклеиновой кислоты. При довольно ясно выраженных некрозах эти изменения достигали максимума через 2—4 дня.

Особенно ярко выражалось утолщение мышечных волокон около массивных некрозов. В этих волокнах через 2—3 дня исчезли первоначальные дистрофические изменения и отчетливо выражалась поперечная полосатость — из-за расположенных на анизотропных полосах гранул рибонуклеиновой кислоты даже на тиониновых препаратах.

В таких мышечных волокнах наблюдается увеличение и набухание ядер. На окрашенных тионином препаратах они просветляются из-за разрежения хроматиновой структуры.

Для доказательства увеличения ядер мы провели кариометрические исследования на 5 контрольных и 5 подопытных крысах. Подопытные животные забивались через 48 часов после введения адреналина.

Так как ткани при заключении в парафине могут сильно сморщиваться, то заключение в парафин сердца контрольного и подопытного животных проводилось в одних и тех же условиях. Рисовальным аппаратом были зарисованы окрашенные тионином препараты: от каждого животного по 100 ядер в про-

дольном разрезе из папиллярных мышц и субэндокардиальной части.

Хотя индивидуальные вариации в обеих группах были значительны, средние размеры ядер у подопытных животных были всегда больше по сравнению с контрольным (таблица).

Таблица 1

Ядрышко-ядерное отношение в волокнах сердечных мышц крыс после введения адреналина

№ опыта	Контрольные крысы				48 часов после введения адреналина			
	Вес * ядра	Вес ядрышка	Ядрышко-ядерное отношение	Число ядрышек	Вес ядра	Вес ядрышка	Ядрышко-ядерное отношение	Число ядрышек
1	4847	206	1 : 23,5	2,35	4978	552	1 : 9,0	3,16
2	3959	156	1 : 25,3	1,86	4943	517	1 : 9,5	2,74
3	5413	238	1 : 23,1	2,18	5805	453	1 : 12,8	2,07
4	6025	210	1 : 28,7	2,02	8291	710	1 : 11,6	3,10
5	6298	202	1 : 31,2	2,22	6501	626	1 : 10,3	2,85
Средние	5308	202	1 : 26,2	2,12	6103	571	1 : 10,5	2,77

* Под весом ядра и ядрышка подразумевается вес снятых на бумагу контуров площадей сечений ядра и ядрышка по 100 ядер.

Вместе с набуханием ядер мы отмечали очевидные изменения в их ядрышках, которые значительно увеличивались и четко выявлялись из-за уменьшения видимого гетерохроматина (рис. 2) в ядре. В некоторых мышечных волокнах, где особенно увеличивалось количество РНК и соответственно с этим также ядрышек, мы наблюдали в таком ядрышке своеобразные кристаллы — признаки высокой активности ядрышек (Хертл — Hertl, 1957; Буш, Бюво, Сметана — Busch, Byvoet, Smetana, 1963). По данным кариометрического исследования их вес увеличивался по сравнению с контрольной группой в 2—3 раза. При этом отношение ядра и ядрышка, которое у нормальных животных было от 1 : 23,1 до 1 : 31,2, приблизилось к 1 : 9. В то же время в ядрах подопытных животных обнаруживалось несколько большее число ядрышек (таблица).

Вышеописанные изменения ядрышек не ограничивались только прилегающими к некротическим очагам областями, но имелись почти во всей остальной сердечной мышце.

С увеличением ядрышек увеличивалось количество внутриклеточной РНК, которая располагалась перинуклеарно, а также

на анизотропных дисках в виде мелких гранул, которые окрашиваются тионином и легко растворяются под действием рибонуклеазы (рис. 2—3).

Все эти изменения развиваются с удивительной скоростью. Заметное увеличение ядрышек и количества РНК происходит после введения адреналина уже в течение 6—12 часов.

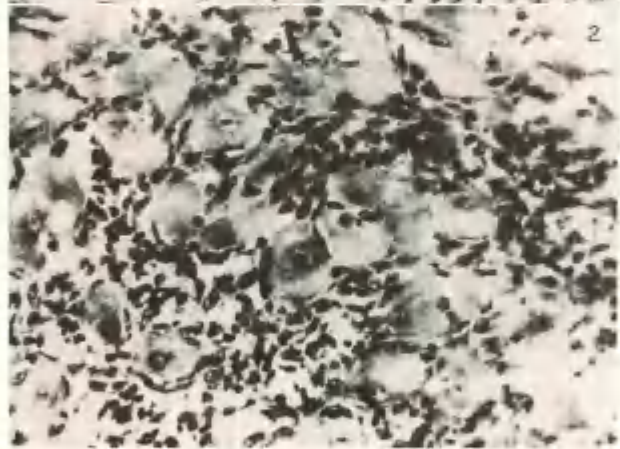
Из вышеуказанного отчетливо выступают признаки усиленного обмена РНК в волокнах сохранившейся сердечной мышцы. Известно, что в биосинтезе белка большую роль играют нуклеиновые кислоты (ДНК и РНК), содержание которых в клетках, способных к интенсивному росту, значительно повышается (Касперссон — Caspersson, 1941). Таким образом, отмеченные нами изменения обмена РНК являются выражением усиленного синтеза сердечномышечных белков и умножения внутриклеточных структур. Они наиболее выражены в тех участках миокарда, которые граничат с некротическими очагами. Эти участки подвергаются после воздействия адреналином обратимой альтерации; вследствие гибели соседних мышечных волокон участки, граничащие с некротическими очагами, несут большую функциональную нагрузку. По нашему мнению, описанные изменения представляют собой проявление репарации клеток миокарда на клеточном уровне после обратимой альтерации. В дальнейшем эта перестройка мышечной клетки направлена на нормализацию сердечной функции в смысле компенсаторной гипертрофии. По мнению Д. С. Саркисова (1962), восстановление функции сердца за счет гипертрофии сохранившихся мышечных волокон является своеобразным репаративным процессом, в ходе которого в месте гиперплазии мышечных волокон происходит умножение внутриклеточных структур (миофибрилл). Д. С. Саркисов называет этот процесс репаративной гипертрофией. Репарация на клеточном уровне является важным способом восстановления функции в тех органах, в которых отсутствуют камбиальные элементы паренхимы.

Ряд авторов (Меерсон Ф. З., 1960; Нови, Фринс, Рей — Nowy, Frings, Rey, 1959) обнаружили с помощью биохимических методик увеличение концентрации РНК в ранней стадии компенсаторной гипертрофии сердца — через 2—7 суток после создания экспериментального порока сердца. Это сходство с нашими данными показывает, что адреналиновые очаговые некрозы миокарда вызывают в прилегающих мышечных воло-

Рис. 1. Сердечная мышца крыс через 48 часов после введения адреналина. Мелкие некрозы, активация соединительной ткани. Базофилия вокруг мышечных ядер. Тионин. Ок. 10, об. 20.

Рис. 2. Поперечный срез миокарда крыс в некротическом очаге. Перинуклеарное накопление РНК в сохранившихся мышечных клетках. Срок опыта 4 дня. Тионин. Ок. 10, об. 40.

Рис. 3. Увеличение ядра и ядрышек с накоплением перинуклеарной РНК. Срок опыта 4 дня. Тионин. Ок. 10, об. 90.



нах принципиально такие же гипертрофические изменения, как при гипертрофии целого сердца.

Как было отмечено выше, повышение метаболизма РНК в клетках сочетается с повышением активности кислой фосфатазы. По литературным данным активность кислой фосфатазы и ее носителей лизосом повышается при переориентации клеточного метаболизма (Наполитано — Napolitano, 1963) или при усиленном синтезе белка (Форбродт — Vorbrodt, 1958). Исходя из этого, повышение активности кислой фосфатазы в наших опытах можно также связать с реорганизацией метаболизма для репарации и последующей компенсаторной гипертрофии.

ЛИТЕРАТУРА

Абрикосов А. И. Частная патологическая анатомия. Медгиз, 1947. — Данилова К. М. О сущности экспериментального адреналинового миокардита. Арх. патол., 23, II, 1961. — Марамаа С. Я. О гистохимических изменениях белков и обмена РНК сердечной мышцы при экспериментальной адреналиновой миокардиодистрофии. Уч. зап. ТГУ, вып. 143, 46, 1963. — Меерсон Ф. З. Компенсаторная гиперфункция и недостаточность сердца. Москва, 1960. — Саркисов Д. С. О формах регенераторной реакции. Эксп. хир. и анест., 2, 3, 1962.

Busch H., P. Byvoet, K. Smetana The nucleolus of the cancer cell. Cancer Res., 23, 313, 1963. — Hertl M. Zum Nucleolus-Problem. Zeitschr. Zellforsch., 46, 18, 1957. — Kellner A., T. Robertson. Selective necrosis of cardiac and skeletal muscle induced experimentally by means of proteolytic enzyme solutions given intravenously. J. Exp. Med., 99, 387, 1954. — Korb K., V. Totović. Licht- und fluoreszenzmikroskopische Befunde am Herzmuskel nach einer akuten, kurzfristigen Coronarinsuffizienz. Virchow's Arch. path. Anat., 336, 475, 1963. — Lewitzky A. Über pathologisch-histologische Veränderungen des Herzens bei Digitalisvergiftungen. Zur Frage der experimentellen Myocarditis. Diss. Petersburg, 1904. — Linzbach A. J. Handbuch der allgemeinen Pathologie. B. VI, Springer Verlag, Berlin, 180, 1955. — Napolitano L. Cytolysomes in metabolically active cells. J. Cell Biol., 18, 478, 1963. — Nowy H., H. Frings, K. Rey. Über den Nukleinsäuregehalt des normalen und hypertrophischen Kaninchenherzens. Experientia, 15, 70, 1959. — Pearce R. M. Experimental myocarditis: a study of the histological changes following intravenous injection on adrenalin. Zentralblatt f. allg. Path., 18, 135, 1906. — Selye H. Conditioning by cortisol for the productions of acute massive myocardial necroses during neuromuscular exertion. Circ. Res., 6, 168, 1958. — Селье Г. Профилактика некрозов сердца химическими средствами. Москва, 1961. — Sos J., T. Kemeny, J. Rigó, I. Budavari I. Alimentary provocation of infarctoid cardiac lesions in rats. Acta Med. Acad. Sci. Hung., 16, 189, 1960. — Vorbrodt A. Histochemically demonstrable phosphatases and protein synthesis. Exp. Cell Res., 15, 1, 1958.

REPARATIVE PROCESSES IN THE MYOCARDIUM DURING EPINEPHRINE MYOCARDIODYSTROPHY

S. Maramaa

Summary

Experimental myocardiodystrophy was induced in rats by single or double injections of epinephrine (in doses of 0.2—0.4 mg). There occurs a remarkable enlargement of nuclei and increase in the nucleolus-nucleus ratio, in the amount of the RNA as well as in the activity of the acid phosphatase in the myocardium. These changes reached the maximal degree in the muscle cells adjoining the necrotic foci.

The features under study indicate the reparative and compensatory processes subsequent to lesion of the myocardium.

РЕГЕНЕРАЦИЯ АОРТЫ ПОСЛЕ АЛЛОПЛАСТИКИ

Т. Ф. Вельгре, А. А. Липпинг, Э. Ю. Сепп, У. Р. Труупыльд

Кафедра факультетской хирургии и Центральная медицинская научно-исследовательская лаборатория Тартуского государственного университета

В современной восстановительной хирургии нашел широкое применение аллопластический метод, в том числе замещение резецированного сегмента кровеносного сосуда аллопротезом. Трубчатый пористый аллопротез является при этом тем субстратом, на котором происходит регенерация кровеносного сосуда. Поэтому такие операции представляют значительный интерес для экспериментальной гистологии.

Несмотря на клинические успехи, методику аллопластики аорты нельзя считать окончательно выработанной. Поэтому особое значение приобретает исследование результатов экспериментальных операций на животных.

Гистологические данные о динамике вживления аллопротеза аорты имеются в работах Вухиз и др. (Voorhees, Jaretzki a. Blakemore, 1952); Данжелло и др. (D'Angelo, Benson a. Grimson, 1955); Хифнагел и Рабил (Hufnagel a. Rabil, 1955); Грифит и др. (Griffith, Eade, Zech a. Harkins, 1955); Пот и др. (Poth, Johnson a. Childers, 1955); Кинмонт и др. (Kinmonth, Taylor a. Lee, 1955); Шамуэй и др. (Schumway, Gliedmann a. Lewis, 1955); Тэйлор (Taylor, 1956); Крич и др. (Creech, Deterling, Edwards, Julian, Linton a. Shumacker, 1957); Джюлиэн и др. (Julian, Deterling, Dye a. Belio, 1957); Харрисон (Harrison, 1957); Пэтри, Гэберер (Petry a. Heberer, 1957); Бэйн (Bain, 1957); Пирпонт и Блэйдз (Pierpont a. Blades, 1957); Мартинез и др. (Martinez, Dahl a. Grindlay, 1957); Шумэкер и др. (Shumacker, Kajikuri, Grice, Rodriguez, Riberi, Moore a. Siderys, 1957); Банэт и Нормэн (Barnett a. Normann, 1958); Эдуадз (Edwards, 1959); Краковский Н. И., 1959; Буянов В. М., 1960; Харитонов Л. Г., 1960; Сироткина М. Г., 1961; Хамфриз и др. (Humphries et al., 1961); Джеллинек и др. (Jellinek, Csillag a. Kadar, 1961); Пашольд (Paschold, 1961); Ратнер Г. Л., 1961; Ц'ай и др. (Ts'ai, Feng, F'ang, Ying, Ch'en C.-C. a. Ch'en C.,

1962; Весоловский (Wesolowski, 1962); Доброва Н. Б. и др., 1963.

По этим данным, после снятия зажимов с аорты начинается отложение фибрина на обе поверхности и в поры протеза. В течение первых месяцев после операции происходит рассасывание фибрина и замещение его соединительной тканью, которая образует фиброзные оболочки вокруг протеза. Просвет протезированного участка сосуда выстилается эндотелием. Некоторые исследователи отмечали также субэндотелиальный слой из гладкомышечных и эластических волокон (Пашольд и др. — Paschold, Wolf a. Wiek, 1960; Желлинек и др. — Jellinek, Csillag a. Kadar, 1961; Флори и др. — Florey, Greer, Kiser, Poole, Telanders a. Werthessen, 1962; Доброва Н. Б. и др., 1963; Давид и др. — David u. a., 1963).

Источником образования фибробластов считают перерезанные концы аорты, соединительную ткань ложи трансплантата, а также мультипотенциальные клетки крови, которые проникают в фибрин (Флори и др. — Florey, Greer, Poole a. Werthessen, 1961; Ратнер Г. Л., 1961; Доброва Н. Б. и др., 1963; Весоловский — Wesolowski, 1962).

Значительные разногласия имеются по вопросу происхождения новых эндотелиальных клеток. По одним данным (Vooghees, Jaretzky a. Blakemore, 1962; Гирвин и др. — Girvin, Wilhelm a. Merendino, 1956; Мейне — Meyne, 1960; Макензи и др. — Mackenze a. Loewenthal, 1960; Буянов В. М., Шлогел — Schloegel, 1961; Давид и др. — David, Hackensellner a. Wolf, 1963) они принимают свое начало от эндотелия или от субэндотелиальных клеток перерезанных концов аорты. Другие считают возможным превращение фибробластов грануляционной ткани в эндотелиальные клетки (Petry a. Heberer, 1957).

В опытах Флори (1961, 1962) был отмечен рост эндотелия вокруг устьев мелких кровеносных сосудов, которые врастали через стенку протеза до его просвета. Кровеносные сосуды в организованном трансплантате были найдены и другими исследователями (Wesolowski et al., 1961, 1962; Schloegel, 1961; Доброва Н. Б. и др., 1963). Наоборот, Ратнер Г. Л. (1961) не наблюдал кровоснабжения тканей, формирующихся на протезе, ни на одной из фаз их развития. Большинство исследователей считает кровообращение трансплантата недостаточным, что приводит к разным поздним дистрофиям и осложнениям (Sauvage a. Wesolowski, 1955; Wesolowski et al., 1961; Wesolowski, 1962).

Среди них на первом месте стоят гиалинизация и фибриноидный некроз соединительной ткани, отложение извести, жировая, миелиодная и костная метаплазия, изъязвление внутренней поверхности трансплантата с тромбозированием.

Что касается различий тканевых процессов при применении разных протезов из разного материала и с разными механиче-

скими свойствами, то они лишь количественные. Это относится особенно к скорости вживления трансплантата. Результаты трансплантации зависят существенно также от вида и возраста реципиента (Girvin, Wilhelm a. Merendino, 1956; Wesolowski, 1962; Крафт-Кинц — Kraft-Kinz, 1963; Доброва Н. Б. и др., 1963). У человека вживление трансплантата происходит гораздо медленнее, чем у животных, особенно у свиньи.

Все это заставляет исследователей заниматься выработкой новых видов аллопротезов.

В настоящей работе сообщаются результаты экспериментальной апробировки разных синтетических протезов — гофрированных вязаных териленовых протезов, изготовленных в 1962 и 1963 годах на Ленинградской текстильной фабрике «Красное Знамя» (рис. 1), и гофрированных тканевых лавсановых протезов, изготовленных в 1963 году на Ленинградской текстильной фабрике «Лентоткацкая фабрика № 2».

Методика

Были произведены 42 операции на взрослых собаках. Применялись протезы длиной от 3 до 14 см и диаметром от 6 до 10 мм. В 16 опытах замещался сегмент грудной аорты, в 21 опыте — брюшной аорты и в 5 опытах — подвздошной и бедренной артерии. Сегмент кровеносного сосуда осторожно отпрепарировался от окружающих тканей. Отходящие коллатерали на протяжении 3—5 см лигировались и резецировались. На освобожденную от окружающих тканей аорту накладывались аортальные зажимы. Сегмент аорты между зажимами перерезался. Кровеносный сосуд и протез соединялись конец в конец. Шов накладывался вручную по методу Карреля. Кровообращение прекращалось от 12 мин. 40 сек. до 46 мин.

Гистологически исследовалось 38 трансплантатов. Целлоидиновые срезы областей анастомозов и средней части трансплантатов окрашивались гематоксилином и эозином по ван-Гизону, также резорцином и фуксином.

Собственные наблюдения

После снятия зажимов через стенку протеза возникает кровоотечение длительностью до 11 минут. Вместе с тем на обеих поверхностях и в порах трансплантата откладывается фибрин, слой которого на внешней стенке трансплантата толще (рис. 2). Так образуются внутренняя и наружная оболочки трансплантата. Они заключают между собой промежуточную оболочку, которая представляет собой протез.

Дальнейший ход процесса начинается рассасыванием фибрина при помощи блуждающих клеток, число которых возра-

стает особенно к концу первой недели опыта. Несмотря на это, резорбция фибрина протекает довольно медленно, особенно в средней части протеза, где фибрин местами сохраняется даже на протяжении нескольких месяцев.

Фибрин замещается регенератом. Источником регенерации являются внутренняя и наружная оболочки аорты, а также соединительная ткань ложи трансплантата.

Средняя оболочка аорты в регенерации не участвует. В наружном слое фибрин в дальнейшем замещается толстоволокнистой неоформленной соединительной тканью. Источником образования ее является адвентиция и периадвентициальная ткань реципиента, отчасти и ложа трансплантата. Соединительнотканная субституция протекает в наружном слое быстрее, чем во внутреннем.

Начальным этапом регенерации внутреннего слоя является возникновение реактивных интимальных утолщений аорты реципиента на границе трансплантата. Из этих утолщений интимы в обоих концах перерезанной аорты вырастают по фибрину в сторону средней части трансплантата мембраны из эндотелиальных клеток и находящихся под ними малодифференцированных клеток (рис. 4). Кроме эндотелиальной выстилки, эти выросты образуют неоформленную соединительную ткань и гладкомышечные клетки во внутреннем слое трансплантата.

Так как основными источниками регенерации являются перерезанные концы аорты, то чем ближе к середине трансплантата, тем моложе соединительная ткань и больше фибрина. Если в концах трансплантата регенерация начинается в начале второй недели после операции и созревание тканей регенерата заканчивается в течение первого месяца, то в середине трансплантата это происходит гораздо позднее. Даже спустя полгода сохраняется местами нерассосавшийся фибрин.

В исходе регенерационного процесса трансплантат приобретает следующее строение. Внутренний слой выстлан эндотелием (рис. 6). Под эндотелием располагаются три слоя гладкомышечных волокон: внутренний и наружный имеют более про-

Рис. 1. Тканевый лавсановый аллопротез. Вид снаружи. Лупа 2,5 х.

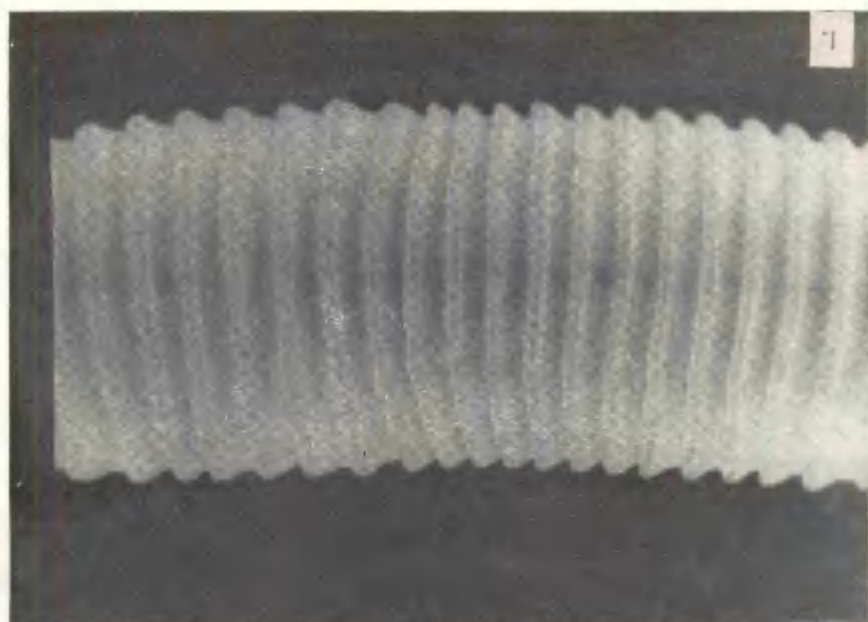
Рис. 2. Трансплантат на грудной аорте. Длительность опыта 10 минут. Каудальная часть трансплантата. 1 — внутренняя оболочка; 2 — протез; 3 — наружная оболочка. Гем.-эоз. Ок. 12,5, об. 3,5.

Рис. 3. Трансплантат на грудной аорте. Длительность опыта 15 дней. Крайняя часть трансплантата. 1 — аорта; 2 — интимальное утолщение; 3 — внутренняя оболочка; 4 — протез. Ван-Гизон. Ок. 12,5, об. 9.

Рис. 4. Протез на грудной аорте. Длительность опыта 24 дня. 1 — регенерат; 2 — фибрин. Гем.-эоз. Ок. 10, об. 20.

Рис. 5. Протез на брюшной аорте. Длительность опыта 189 дней. Внутренняя поверхность трансплантата. Лупа. 2 ×.

Рис. 6. Протез на брюшной аорте. Длительность опыта 150 дней. Каудальная часть трансплантата. 1 — внутренняя оболочка; 2 — протез; 3 — наружная оболочка. Гем.-эоз. Ок. 12,5, об. 9.







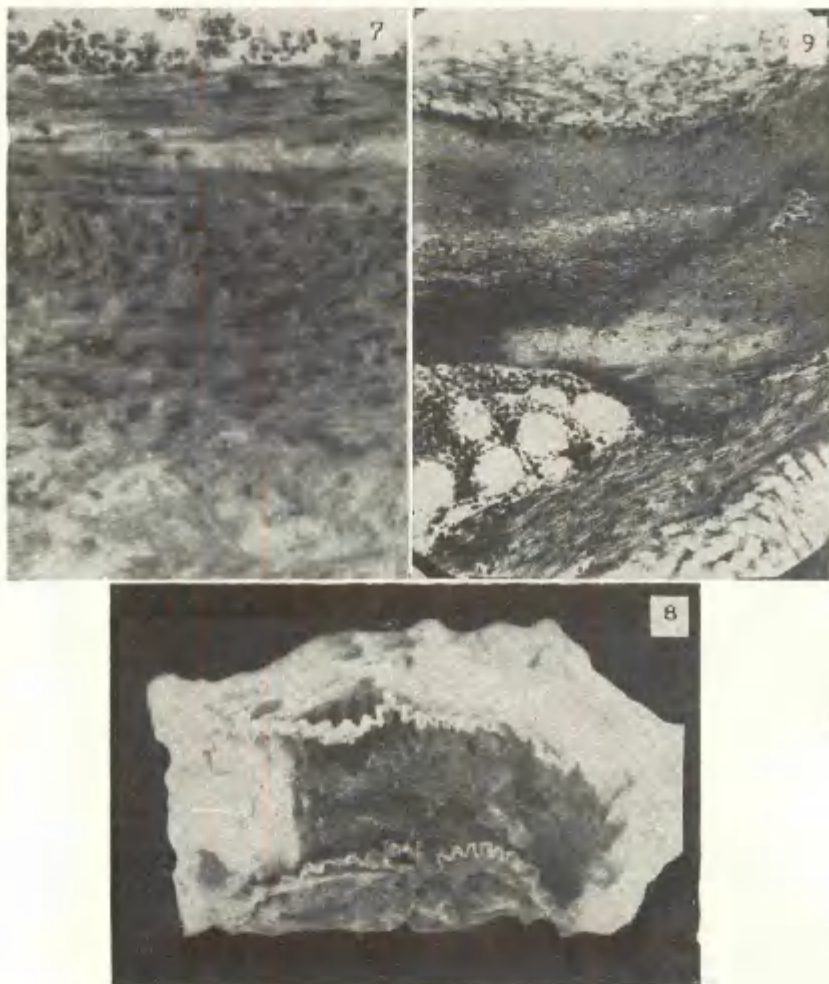


Рис. 7. Протез на брюшной аорте. Длительность опыта 150 дней. Средняя часть трансплантата. 1 — эндотелий; 2 — три слоя гладкомышечных волокон; 3 — волокнистая соединительная ткань. Ван Гизон Ок 10. об 20.

Рис. 8. Протез на брюшной аорте. Длительность опыта 286 дней. Внутренняя поверхность трансплантата покрыта громбом. Лупа 2X.

Рис. 9. Протез на грудной аорте. Длительность опыта 143 дня. Внутренняя оболочка. 1 — эндотелий; 2 — слой гладкомышечных волокон; 3 — костная ткань; 4 — миелидная ткань; 5 — протез. Ван Гизон. Ок. 12,5 об. 9.

дольный ход, средний между ними более циркулярный (рис. 7). Кроме гладкомышечных, здесь имеется большое количество эластических волокон. Начиная со второго месяца после операции, в интимальных утолщениях также отмечается много гладкомышечных и эластических клеток.

Остальная часть внутреннего слоя состоит из более рыхлой неоформленной соединительной ткани, а наружный из более плотной неоформленной соединительной ткани.

Вместе с соединительной тканью, из окружающих тканей в трансплантат врастают в виде широких капилляров также кровеносные сосуды, которые доходят до слоя гладкомышечных волокон во внутренней оболочке трансплантата.

Следует отметить очень слабое раздражающее влияние волокон протеза на соединительную ткань. Она хорошо прорастает сквозь его поры. Клетки инородных тел едва различимы в виде очень уплощенных образований на волокнах, воспалительная реакция отсутствует совсем.

В своей работе мы встречались с разными осложнениями, которые привели к неудовлетворительным результатам в хирургическом смысле. Как ранние, так и поздние осложнения вызывали образование тромба на внутренней поверхности трансплантата (рис. 8).

Ранние осложнения обусловлены задержкой регенерации из-за разжижения и вялого рассасывания фибрина. Отсутствие эндотелия на внутренней поверхности трансплантата создает благоприятные условия для возникновения тромба.

Позднее тромбообразование связано с дистрофическими процессами во внутренней оболочке, что приводит к изъязвлению ее. Вокруг язв плазма крови впитывается между соединительной тканью и эндотелием и отслаивает последний, что приводит к постепенному увеличению язв.

Дистрофическими процессами во внутреннем слое являются гиалинизация коллагеновых волокон с отложением извести между ними и фибриноидный некроз.

В качестве поздних осложнений, начиная со второго полугодия после операции, отмечается жировая и миелоидная метаплазия рыхлой соединительной ткани внутренней оболочки трансплантата. Над жировой и миелоидной тканью ближе к внутренней поверхности происходит костная метаплазия с превращением фибробластов в остециты и возникновением костного основного вещества между ними (рис. 9). Над костной тканью возникает отслоение поверхностных слоев с изъязвлением внутренней поверхности.

Обсуждение

Как вытекает из вышеизложенного, после замещения резецированного участка аорты пористым аллопротезом происходит значительная регенерация. Так как регенерация после повреждения кровеносного сосуда происходит в обычных условиях лишь в незначительной степени, становится ясной роль протеза как субстрата для восстановления целостности и новообразования тканевых элементов кровеносного сосуда.

Главными источниками регенерации являются внутренняя оболочка аорты и соединительнотканная ложа трансплантата. Средняя оболочка аорты в регенерации не участвует. Это обуславливается, по-видимому, кроме биологических свойств ее еще тем, что на краях разреза и в области швов анастомоза образуется некротическая зона средней оболочки, которая очень медленно рассасывается.

Особенно важна роль возникновения интимальной подушки аорты в областях анастомозов. Значение внутренней оболочки кровеносных сосудов как регенерационного камбия показано в работах Н. Г. Хлопина (1958) и С. И. Щелкунова (1961).

Из интимальных утолщений с обеих сторон по фибрину или грануляционной ткани в сторону центральной части трансплантата врастают малодифференцированные клетки, из которых образуются гладкомышечные клетки с эластическими волокнами. Посредством того же регенерата образуются и эндотелии. Требуется дальнейшее специальное исследование для выяснения их происхождения в регенерате: образуются ли они из малодифференцированных клеток субэндотелиального слоя, как утверждают С. И. Щелкунов и его сотрудники (Го-Жень-Юй, 1961), или из самых эндотелиальных клеток (Хлопин Н. Г., 1958).

Из-за происхождения внутренних слоев внутренней оболочки трансплантата именно из интимальных подушек, для благоприятного исхода операции особенное значение имеет длина протеза. Чем длиннее протез, тем медленнее и позднее совершается регенерация центральных участков протеза.

Эндотелий и слой гладкомышечных волокон в трансплантате соответствуют внутренней и мышечной оболочкам аорты. Наружная оболочка трансплантата образуется разрастанием соединительной ткани адвентиции аорты и ложи трансплантата. Та же ткань, прорастая через поры протеза, образует наружную часть внутренней оболочки трансплантата. Быстрота образования наружной оболочки отмечена также Н. Б. Добровой (1963).

Рассасывание фибрина и регенерация во внутренней оболочке совершается гораздо медленнее. Вообще рассасывание фибрина в трансплантате довольно вялое. В опытах Джеллинека и др. (1961) даже на 106-ой послеоперационный день найден

конденсированный фибрин; то же наблюдалось и в нашем материале. Свойства и условия рассасывания фибрина в трансплантатах требуют дальнейшего исследования.

Что касается образования костной и миелоидной ткани, то оно не является редким явлением при патологических процессах артерий (Аничков Н. Н., 1947). Интересно, что этот процесс возникает также в трансплантатах. Отложение солей кальция свойственно протезам низкой пористости (Wesolowski et al., 1961) и указывает на недостаточное питание названного участка (Совидж и др. — Sauvage et al., 1955). На образование костной, миелоидной и особенно жировой ткани в аллотрансплантатах кровеносных сосудов в литературе обращалось недостаточно внимания. В наших опытах мы не смогли установить костной метаплазии с предшествующими значительными кальцификатами.

Исходя из довольно высокого процента тромбозирования и большого числа осложнений, можно считать исследования в области аллопластики не напрасными. Хальперт и др. (Halpert et al., 1960) первыми утверждали, что идеальный аллопротез должен состоять из материала, волокна которого чередуются с абсорбирующими гемостатическими волокнами.

После рассасывания части волокон создаются хорошие условия для миграции фибробластов и эндотелиальных клеток. В настоящее время уже имеются сведения, показывающие, что при так называемых сложных протезах поздние осложнения возникают намного позже (Wesolowski et al., 1963) и для полной эндотелизации таких протезов длиной в 45 см на свиньях требуется только 7 дней (Джордан и др. — Jordan et al., 1962).

В дальнейшей работе необходимо глубже выяснить биологические закономерности рассасывания фибрина и регенерации элементов сосудистой стенки. Надо продолжать поиски протезов, которые создали бы оптимальные условия для регенерации, а также найти возможности ее стимуляции.

ЛИТЕРАТУРА

Аничков Н. Н. В кн.: Абрикосов А. И. Частная и патологическая анатомия. Вып. II, 328, Медгиз, 1947. — Буянов В. М. Замещение дефекта грудной аорты каркасным нейлоновым протезом. Автореферат, Москва, 1960. — Го-Жень-Юй. Изменения интимы крупных кровеносных сосудов при регенерации. Арх. анат., гистол. и эмбр., 41, 7, 90, 1961. — Доброва Н. Б., Н. А. Быкова, А. В. Покровский, А. Д. Дрогайцев. Об аллопластике сосудов. Экспер. хир. и анест., 3, 41, 1963. — Краковский Н. И. Современное состояние вопроса о пластике артерий. Хирургия, VIII, 3, 1959. — Ратнер Г. Л. Сравнительная оценка и применение комбинированного сосудистого протеза (экспериментально-клиническое исследование). Автореферат. Челябинск, 1961. — Сироткина М. Г.

Замещение дефекта полых вен. Хирургия, V, 12, 1961. — Харитонов Л. Г. Аллопластика прудного отдела пищевода в эксперименте. Хирургия, III, 170, 1960. — Хлопин Н. Г. Специфичность эндотелия, регенеративные возможности и взаимоотношения тканей сосудистой стенки. Арх. анат., гистол. и эмбр., 35, I, 13, 1958.

Bain W. H. Arterial Prostheses. J. R. Coll. Surg. Edinb., 3, 4, 241, 1957. — Barnett W. O., T. D. Norman A histologic study of the tissues surrounding experimental nylon aortic substitutes. Arch. Surg., 76, 3, 389, 1958. — Creech O., S. Deterking, S. Edwards, O. C. Julian, R. R. Linton, H. Schumacker Vascular prostheses. Report of the committee for the study of vascular prostheses of the society for vascular surgery. Surgery, 41, 1, 62, 1957. — D'Angelo G. J., W. R. Benson, K. S. Grimson Vinyon-N cloth tube for bridging arterial defects. Arch. Surg., 70, 1, 39, 1955. — David H., Hackensellner, W. Wolf. Submikroskopische Untersuchungen an der Neointima in Kunststoffprothesen beim Hund. Frankfurt, Z. Path., 72, 6, 548, 1963. — Edwards W. S. Progress in synthetic graft development — an improved crimped graft of teflon. Surgery, 45, 2, 289, 1959. — Florey H. W., S. J. Greer, J. Kiser, J. C. F. Poole, R. Telandier, N. T. Werthessen. The development of the pseudointima lining fabric grafts of the aorta. Brit. J. Exp. Path., 43, 6, 655, 1962. — Florey H. W., S. J. Greer, J. C. F. Poole, N. T. Werthessen. The pseudointima lining fabric grafts of the aorta. Brit. J. Exp. Path., 42, 3, 236, 1961. — Girvin G. W., M. C. Wilhelm, K. A. Merendino The use of teflon fabric as arterial grafts. An experimental study in dogs. Amer. J. Surg., 92, 2, 240, 1956. — Griffith C. A., G. G. Eade, R. K. Zech, H. N. Harkins A new technique for compilation arterial grafts: Vinyon "N" cloth supplemented with a logitudinal autogenous arterial strip. Surg. Gynec. Obstet., 101, 2, 225, 1955. — Halpert D., M. E. De Bakey, G. L. Jordan, W. S. Henly The fate of homografts and prostheses of the human aorta. Surg. Gynec. Obstet., 111, 6, 659, 1960. — Harrison J. H. The use of teflon as a blood vessel replacement in experimental animals. Surg. Gynec. Obstet., 104, 1, 81, 1957. — Hufnagel C. A., P. Rabil Replacement of arterial segments, utilizing flexible orlon prosthesis. Arch. Surg. 70, 1, 105, 1955. — Humphries A. W., W. A. Hawk, A. M. Cuthbertson. Arterial prosthesis of collagen. Impregnated dacron tulle. Surgery, 50, 6, 947, 1961. — Jellinek H., J. Csillag, A. Kadar Regeneration of vessel walls after the implantation of knitted synthetic tubes. Acta Chir. Acad. Sci. Hung., 2, 1, 1, 1961. — Jordan G. L., M. M. Stumf, M. E. De Bakey, B. Halpert. Endothelial lining of dacron protheses of porcine thoracic aortas. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 110, 2, 340, 1962. — Julian O. C., R. A. Deterling, W. S. Dye, M. L. Belio. Dacron tube and bifurcation arterial prostheses produced to specifications. J. 4927, 1406, 1955. — Kraft-Kinz J. Zum Problem der Einheilung synthetischer Arterienprothesen beim Menschen. Langenbecks Arch. klin. Chir. 303, 2, 123, 1963. — Mackenzie D. C., J. Loewenthal. Endothelial growth in nylon vascular grafts. Brit. J. Surg., 48, 208, 212, 1960. — Martinez N. S., E. V. Dahl, J. H. Grindlay. Early tissue response to polyvinyl sponge aortic grafts. Surgery, 42, 6, 1002, 1957. — Meyne N. G. Endothelial growth in nylon vascular Prostheses. Arch. Chir. Neerl., 11, 1, 41, 1959. — Paschold K. Untersuchungen zur Gefäßwandlerneuerung nach Implantation von alloplastischem Material. Zbl. Chir., 86, 4a, 252, 1961. — Paschold K., O. Wolf, J. Wiek. Über die weitere experimentelle Entwicklung alloplastischen Gefäßprothesen und ihren klinischen Einsatz. Zbl. Chir., 23, 1293, 1960. — Petry G., G. Heberer. Die Neubildung der Gefäßwand auf der Grundlage synthetischer Arterienprothesen. Langenbecks Arch. klin. Chir., 286, 3, 249, 1957. — Pierpoint H., B. Blades. Heat sealed dacron taffeta blood vessel replacement Surg. Gynec. O tet., 105, 3, 370, 1957. — Poth E. J., J. K. Kohnson, J. H. Childers. The use of plastic fabrics as arterial prostheses. Ann, Surg., 142, 4, 624, 1955. — Sauvage L. R. S. A. Wesolowski, The healing and fate of arterial grafts. Surgery, 38, 12, 1090, 1955. — Schloegel G. La croissance

de l'endothelium dans les protheses vasculaires en nylon. Presse Méd., 69, 13, 600, 1961. — Shumacker H. B., H. Kajikuri, P. Grice, R. Rodriques, A. Riberi, T. S. Moore, H. Siderys. Comparative experimental study of aortic grafts. Surgery, 41, 6, 943, 1957. — Shumway N. E., M. L. Gliedman, F. J. Lewis. An experimental study of the use of polyvinyl spones for aortic grafts. Surg. Gynec. Obstet., 100, 6, 703, 1955. — Taylor G. W. Orlon prostheses in arterial grafting. Proc. Roy. Soc. Med., 49, 6, 339, 1956. — Ts'ai C.-Y., Y.-H. Feng, C.-Y. Tang, Y.-Y. Ying, C.-C. Ch'en, C. Ch'en. Experimental and clinical results on the use of silk taffeta as a synthetic vascular prothesis. Chin. Med. J., 81, 2, 93, 1962. — Voorhees A. B., Jaretzki, A. H. Blakemore. The use of tubes constructed from vinyon «N» cloth in bridging arterial defects. A preliminary report. Ann. Surg., 135, 3, 332, 1952. — Wesolowski S. A. Evaluation of tissue and prosthetic vascular grafts. Charles C. Thomas Publisher. Springfield, Illinois, USA, 1962. — Wesolowski S. A., C. C. Fries, R. T. Domingo, W. J. Liebig, P. N. Sawyer. The compound prosthetic vascular graft: A pathologic survey. Surgery, 53, 1, 19, 1963. — Wesolowski S. A., C. C. Fries, K. E. Karlson, M. De Bakey, P. N. Sawyer. Porosity: primary determinant of ultimate fate of synthetic vascular grafts. Surgery, 50, 1, 91, 1961.

ON THE REGENERATION OF THE AORTA FOLLOWING AN ALLOPLASTIC OPERATION

T. Velgre, A. Lipping, E. Sepp, U. Truupõld

Summary

Knitted porous terylene and lavsan prostheses were implanted in the aorta of 38 dogs. After 10 minutes to 313 days the dogs were killed and a histological study was made.

Immediately after implantation a fibrin coat forms on both surfaces of the prosthesis. Subsequently, the absorption of the fibrin and its replacement by regenerate take place. The latter arises from the perigraft connective tissue and from the severed ends of the aorta, where intimal thickenings are formed. As the regeneration is completed, the graft is formed by two coats, separated by prosthesis material. The outer coat consists of connective tissue. The deeper part of the inner coat is somewhat looser. Formation of adiposa and myeloid tissue as well as osteoid metaplasia can be noted there. The inner part of the inner coat originates from intimal thickenings in the severed ends of aorta and is formed by endothelial lining and smooth muscle cells. The regeneration proceeds from the lines of anastomosis toward the centre of the graft. Therefore, in the centre of a long prosthesis, bare areas can be noted even after months. This as well as any dystrophic changes in the inner coat may give rise to thrombosis.

РОСТ И ПРЕВРАЩЕНИЕ ЭПИТЕЛИЕВ МАТКИ И ВЛАГАЛИЩА КРЫС В ОЧАГЕ АСЕПТИЧЕСКОГО ВОСПАЛЕНИЯ

М. Д. Тилева

Лаборатория экспериментальной гистологии Института экспериментальной
медицины АМН СССР, Ленинград

До настоящего времени вопрос о способности к метаплазии однослойного цилиндрического эпителия матки в многослойный плоский эпителий остается еще спорным. Многие исследователи, изучавшие реактивные изменения эпителия матки в экспериментальных условиях и на клиническом материале (Мейер — Meyer, 1910; Ш. Д. Галустян, 1933; С. С. Роговенко, 1958; В. П. Михайлов и К. М. Ярославцева, 1959 и др.), подчеркивали, что эпителии матки и влагалища не способны к взаимному превращению и представляют собой ткани, отличающиеся по своим потенциям. Наряду с этим ряд авторов описывали случаи превращения однослойного эпителия матки в многослойный плоский.

Одним из наиболее солидных доказательств в пользу этой метаплазии являются результаты исследований С. П. Ржевуцкой (1948, 1956), выполненные под руководством Ф. М. Лазаренко, методом культивирования тканей в организме. По ее данным, эпителий матки кролика в очаге асептического воспаления образует многоярусные и многослойные структуры. Последние, в отличие от того, что обнаруживается в эпителиальных пластах эктодермального происхождения, не обнаруживают резко выраженной вертикальной анизоморфности и признаков ороговения. «Опыты культивирования в организме показывают», пишет О. П. Ржевуцкая, «что эпителий матки не может быть признан однослойным и проявляет свои генетические свойства многоярусного эпителия в различных модификациях. Это ставит под сомнение существующую в настоящее время теорию о происхождении маточного эпителия из мезодермы.» (1948, стр. 104). О. П. Ржевуцкая имплантировала также эпителий влагалища кролика (1951). Как известно, он имеет однослойное цилиндри-

ческое строение. По ее данным, он так же, как эпителий матки, образовал и многоядные и многослойные структуры.

Естественно возникла мысль о повторении опытов по имплантации маточного эпителия, в сопоставлении с эпителием влагалища, на животных, эпителий которых, как и у человека, имел бы строение многослойного плоского. Необходимость постановки этих опытов усугублялась тем, что О. П. Ржевуцкая окрашивала препараты гематоксилином Вейгерта — эозином, который не дает возможности выявить достаточно четко клеточные границы. Естественно, что ею не были использованы в то время гистохимические методы, позволяющие более тонко выявить различия обменных процессов в исследуемых тканях.

Наше исследование выполнено по методу Ф. М. Лазаренко (1934, 1959). Реципиентами служили 30 белых половозрелых крыс — самок весом 200—230 г. Донорами — 100-граммовые крысята. Стенки рогов матки и собственно влагалище измельчались и смешивались с кусочками целлоидина в отношении 1 : 2. Имплантация проводилась под кожу брюшной стенки реципиента. С правой стороны имплантировали эпителий матки, а с левой стороны эпителий влагалища. Подготовка материалов для посева и операция производились при строго стерильных условиях. Имплантаты извлекались и фиксировались в жидкостях Карнуа и Бранка через 1, 2, 3, 5, 7, 10, 14 и 21 суток после начала опыта. Парафиновые срезы окрашивались гемалаун-эозином, азури II-эозином, железным гематоксилином Гейдеггайна. Кератин выявлялся по Шубичу, мукополисахариды по Хочкису, муцикармином по Мейеру и по Моури. Всего было изучено гистологически 60 имплантатов.

Слизистая оболочка матки у 100-граммовых крысят выстлана однослойным изопризматическим эпителием. В подлежащей соединительной ткани образуются крипты. При окраске по Хочкису на поверхности клеточного пласта выявляется тонкая красная полоска. Это свидетельствует о выделении эпителиальными клетками мукополисахаридов.

В железах мукополисахаридов значительно больше. Цитоплазма клеток слабо базофильная. Клеточные ядра имеют овальную форму, содержат мелкие глыбки хроматина и 1—2 ядрышка. Ядра располагаются на разных уровнях обычно ближе к базальной мембране. На препаратах, окрашенных железным гематоксилином, четко выступают замыкающие полоски и клеточные границы. Митотически делящиеся клетки сдвигаются к наружной поверхности эпителиального пласта. Соединительная ткань имеет характер так называемой цитогенной: она содержит много малодифференцированных клеток с незначительным количеством тонких коллагеновых волокон.

Слизистая оболочка влагалища крысят покрыта многослой-

ным плоским эпителием. Подлежащая соединительная ткань образует сосочки, и поэтому толщина эпителия различна. Базальный слой состоит из призматических клеток с выраженной базофилией цитоплазмы. В этом слое происходит митотическое деление клеток. Клетки 1—2-х поверхностных слоев вырабатывают слизь окрашивающаяся в красный цвет по Хочкису. При увеличении ее количество клетки поверхностного слоя могут принимать вертикальное расположение. Подлежащая рыхлая соединительная ткань содержит относительно мало клеток, но богата коллагеновыми волокнами.

Общие изменения в имплантатах были неоднократно описаны Ф. М. Лазаренко и его сотрудниками. В соединительной ткани реципиента вокруг имплантата формируется очаг асептического воспаления с расширением кровеносных сосудов, эмиграцией элементов белой крови. Позднее развивается грануляционная ткань, врастающая в мецеллоидиновые пространства. Вокруг целлоидина образуются гигантские многоядерные клетки. Наряду с полибласти и фибробластами во всех случаях встречаются плазматические клетки.

Эпителий матки

Через сутки после имплантации маточного эпителия травмированные в процессе измельчения органа клетки гибнут. Сохранившиеся клетки поверхностного пласта и желез дедифференцируются: базофилия цитоплазмы повышается, увеличивается величина ядрышка. Клетки маточного эпителия, уплощаясь, начинают продвигаться в виде однослойного пласта по соединительной ткани. В эпителизации принимает участие и эпителий желез (рис. 1). Через двое суток начинается митотическое размножение эпителиальных клеток; продвижение эпителия ускоряется. Таким образом по нашим данным, также как и в опытах О. И. Топчиевой (1956) и В. П. Михайлова и К. М. Яровславцевой (1959), изучавших регенерацию эпителия матки после его механического повреждения, первоначальное уплощение эпителиальных клеток предшествует их активному митотическому делению.

В ранние сроки имплантации эпителиальный пласт состоит из уплощенных клеток. В дальнейшем он становится кубическим, а потом цилиндрическим (рис. 2а).

Эпителий матки обычно обрастает некротические массы, всегда имеющиеся в имплантате, в результате этого образуются замкнутые кисты. Необходимо подчеркнуть, что он никогда не обрастает кусочки целлоидина. Наряду с ростом эпителия матки по поверхности, наблюдается его погружной рост в грануляционную ткань, в виде трубочек (рис. 3а).

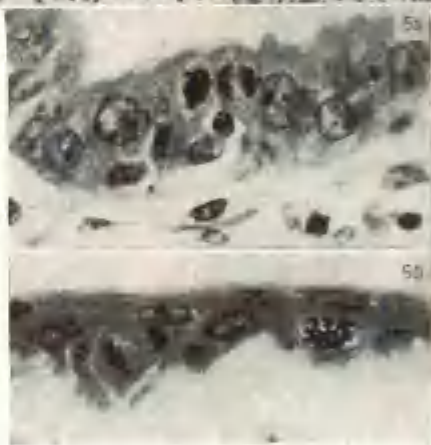
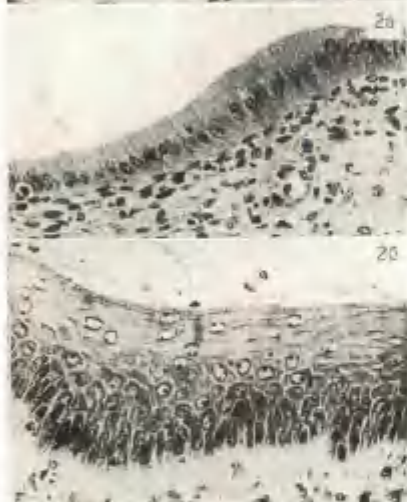
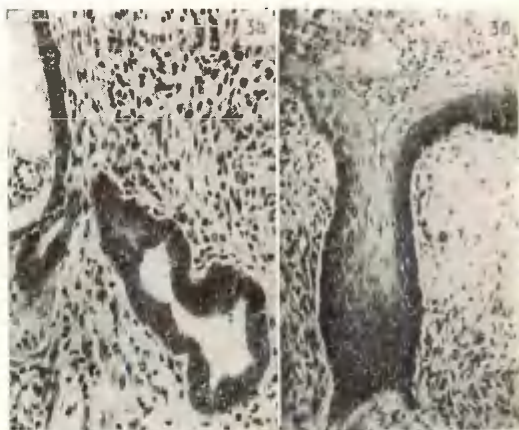
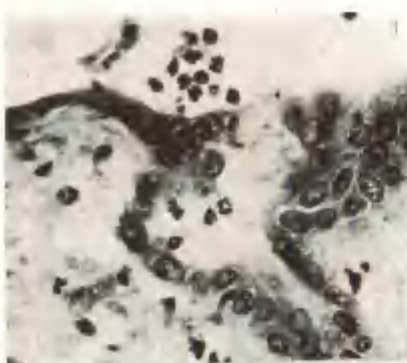


Рис. 1. Трехсуточный имплантат. Продвижение уплощающихся клеток однослойного эпителия матки по соединительной ткани. Фиксация по Бранка, окраска гемалаун-эозином. Микрофото об. $60\times$, гомаль VI (общее увеличение 800).

Рис. 2. Однослойный призматический эпителий в десятидневном имплантате матки (а) и многослойный ороговевающий эпителий в пятидневном имплантате влагалища (б). Фиксация по Бранка, окраска гемалаун-эозином. Микрофото об. $20\times$, гомаль IV (общее увеличение 460).

Рис. 3. Эпителиальные разрастания в грануляционной ткани семидневных имплантатов матки (а) и влагалища (б). Фиксация по Бранка, окраска гемалаун-эозином. Микрофото об. $20\times$, гомаль VI (а) и об. $20\times$, ок. 7 (б). (Общее увеличение 272 (а) и 190 (б)).

Рис. 5. Митозы в семидневном имплантате эпителия матки (а) и в трехдневном имплантате многослойного плоского эпителия влагалища (б). Фиксация по Карнуа, окраска гемалаун-эозином. Микрофото об. $60\times$, гомаль IV (общее увеличение 1360).

В результате продолжающегося митотического деления увеличивается количество клеток в эпителиальной выстилке кист. Поэтому на более поздних сроках клетки вытягиваются и истончаются, ядра их при этом располагаются на разном уровне, но все клетки доходят от соединительнотканной подстилки до свободной поверхности (рис. 4). Митотически делящиеся клетки всегда сдвигаются к наружной поверхности эпителиального пла-

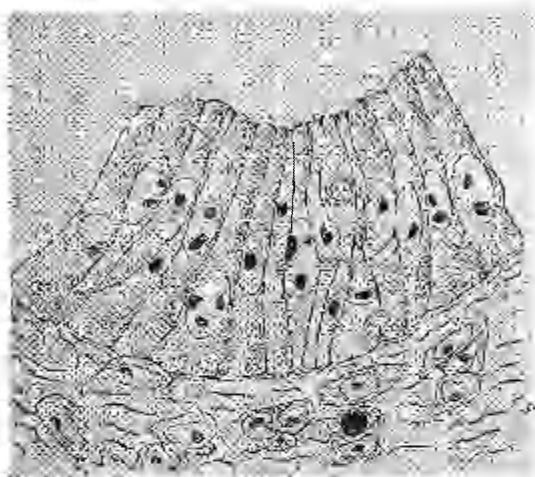


Рис. 4. Участок эпителиальной выстилки кист в семидневном маточном имплантате. «Ложная многорядность» эпителиального пласта. Фиксация по Карнуа, окраска железным гематоксилином Гейденгайна. Рисунок сделан с помощью рисовального аппарата на уровне рабочего стола. Об. 60 \times , окуляр 10 \times .

ста (рис. 5а). При окраске по Хочкису и Моури количество мукополисахаридов не превышает того, которое имело место в норме. В полости кисты мукополисахариды накапливаются в значительном количестве. В эпителиальном пласте обнаруживаются отдельные лейкоциты и лимфоциты.

Через 10 дней имплантации в эпителий обнаруживаются дистрофические признаки; увеличивается количество клеток с пикнотическим ядром и вакуолями в цитоплазме. К концу исследуемого срока (21 сутки) эпителий кисты распадается, жидкое содержимое рассасывается и в этих местах развивается рубцевая ткань.

Наш материал позволяет понять, как нам кажется, выводы, к которым пришла О. П. Ржевуцкая. На поздние сроки имплантации эпителий матки кист (особенно на препаратах, окрашен-

ных гемалаун-эозином) действительно походит на многорядный. Однако, как уже было сказано, эта многорядность ложная. Образования настоящего многорядного эпителия (пласта, в котором ядра располагаются на разном уровне, но не все клетки доходят от соединительнотканной подстилки до свободной поверхности) мы не видели. При окраске железным гематоксилином Гейденгайна четко видно, что в пределах одного и того же эпителиального участка, на срезе, число замыкающих пластинок, ограничивающих наружные края клеток, и число ядер одинаковые (на рис. 4 их 16). Иными словами, все клетки доходят здесь до свободной поверхности. Равным образом не наблюдали мы на нашем материале образования эпителия матки каких-либо многослойных структур. Повод к тому, чтобы говорить о появлении многослойности, могут дать только тангенциальные срезы. На препаратах, окрашенных гемалаун-эозином, такие места могут создать впечатление многослойности. Анализ препаратов, окрашенных железным гематоксилином, показывает однако, что там, где срез прошел вертикально, эпителиальный пласт имеет однослойное строение (рис. 6).

Эпителий влагалища

Через сутки после имплантации влагалищного эпителия, поверхностные клетки его дифференцируются и отторгаются чешуйками или роговыми пластами. Клетки базального и шиповатого слоев несколько округляются, цитоплазма становится базофильной, ядрышки увеличиваются в объеме. Они уже через сутки начинают продвигаться по соединительной ткани в виде многослойного пласта. Через двое суток обнаруживаются митозы, которые располагаются в базальных слоях эпителиального пласта (рис. 5б). Эпителий растет вдоль целлоидина, отделяя некротические массы, и обрастает фрагменты органа. Край нарастания эпителия имеет форму клина. В передних клетках его митозы не наблюдались. При обрастании некротические массы образуют замкнутые кисты. Одновременно происходит и погружной рост эпителия в глубину соединительной ткани. При этом возникают ветвящиеся трехмерные тяжи различной формы (рис. 3б), которые неоднократно описывал В. Г. Гаршин как воспалительные разрастания кожного эпителия (1939). Через 5 суток наступает дифференцировка эпителиального пласта. Базальные клетки сохраняют свой камбиальный характер, поверхностные же ороговевают (рис. 2б). Скорость ороговеания эпителия, обрастающего кусочки целлоидина, значительно выше, чем эпителия, выстилающего кисты. В массивных эпителиальных тяжах малодифференцированными остаются клетки, расположенные на периферии у соединительной ткани. Ороговеанию подвергаются клетки расположенных в центральной части тяжей. Местами в таких тяжах образуются роговые жемчужины.

Таким образом, рост и превращение эпителиев матки и влагалища крыс в очаге асептического воспаления происходит различно.

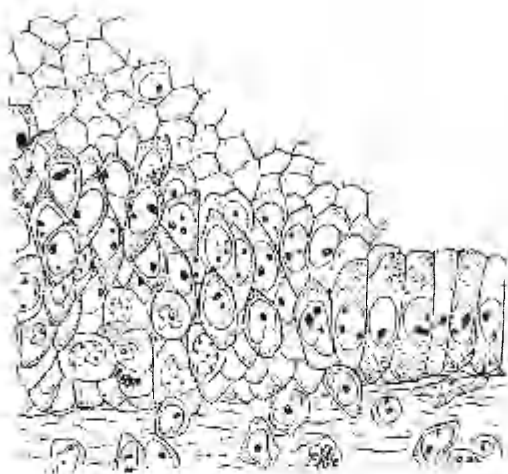


Рис. 6. Участок эпителиальной выстилки семидневного маточного имплантата. Справа эпителий на вертикальном разрезе, слева — на тангенциальном. Фиксация по Карнуа, окраска железным гематоксилином Гейденгайна. Рисунок сделан с помощью рисовального аппарата на уровне рабочего стола. Об. 60 \times , окуляр 10 \times .

Эпителий матки всегда однослойный. Клетки его выделяют мукополисахариды. Митозы во всех случаях располагаются в апикальной части пласта. Эпителий влагалища многослойный плоский ороговевающий с расположением митозов в базальной части пласта. Наши данные подтверждают представления Н. Г. Хлопина (1934, 1946) о различной природе эпителиев мюллеровского и эктодермального происхождения, которые в естественной системе гистологических структур должны занимать различное место.

ЛИТЕРАТУРА

Галустян Ш. Д. Über die Verwandlungen des Epithels der Gebärmutter im Explantat. Arch. exp. Zellforsch., 1933, 13. 632—660. — Гаршин В. Г. Воспалительные разрастания эпителия, их биологическое значение и отношение к проблеме рака. М., Медгиз, 1939. — Лазаренко Ф. М.

Опыт применения нового метода к экспериментальному изучению тканей и его предварительные результаты. Архив биол. наук, 1934, 34, 5—6, 707—720; Закономерности роста и превращения тканей и органов в условиях культивирования их в организме. М., Медгиз, 1959. — Михайлов В. П. и Ярославцева К. М. Посттравматическая регенерация эпителия матки кролика при лучевой болезни. Архив анатом., гистол. и эмбриол., 1959, 37, 8, 59—70. — Ржевудкая О. П. Эпителий матки в экспериментальных условиях. Тезисы докладов научно-методологической конференции анатомов, гистологов и эмбриологов зооветеринарных сельскохозяйственных вузов, М., 1948, стр. 104. Эпителий женских половых путей в экспериментальных условиях. Труды пятого всесоюзного съезда анатомов, гистологов и эмбриологов, Л., 1951, стр. 548—549; Гистологическая природа маточного эпителия и его морфология в экспериментальных условиях. Труды Ставропольского сельскохозяйственного института, 1956, 7, 479—484. — Роговенко С. С. О гистогенезе эпителиальных покровов шейки матки человека. Труды Института онкологии, 1958, 2, 149—160. — Топчиева О. И. О регенерации эпителия матки при поверхностном механическом повреждении слизистой оболочки. Архив анатом., гистол. и эмбриол., 1956, 33, 4, 49—54. — Хлопин Н. Г. О превращениях вне организма производных вольфова и мюллерова канала и о специфичности эпителиальных тканей мезодермального происхождения. Архив биол. наук, 1934, 34, 1—3, 187—191; Общебиологические и экспериментальные основы гистологии. Издательство Академии Наук СССР, М., 1946. — Шубич М. Г. Методика гистологического обнаружения кератина с помощью кислого раствора основного коричневого. Архив анатом., гистол. и эмбриол., 1963, 49, 6, 114—116. — Meyer R., Über Erosio portionis uteri. Verh. Dtsch. Path. Ges., 1910, 14, 256—259.

GROWTH AND TRANSFORMATION OF UTERINE AND VAGINAL EPITHELIA OF RAT IN THE FOCUS OF ASEPTIC INFLAMMATION

M. D. Tileva

Summary

Minced pieces of uterine and vaginal mucosa were implanted after the Lazarenko method.

After implantation there occurs formation of epithelial sheaths enveloping implanted celloidine and fragments as wells as necrotic foci, and infiltrative growth of epithelial cells into the granulation tissue. In the latter, the uterine epithelium presents tubules, lined with a simple cuboidal or columnar epithelium, secreting acid mucopolysaccharides after secondary differentiation. As opposed to the uterine epithelium, the vaginal one forms ramified solid cords and sheets which differentiate into the stratified squamous epithelium.

The different behaviour of the epithelia under study accords with the ectodermal nature of the vaginal epithelium versus the Muellerian nature of the uterine one.

ИЗМЕНЕНИЯ ВЛАГАЛИЩНОГО ЭПИТЕЛИЯ В ОРГАНОТИПИЧЕСКИХ КУЛЬТУРАХ

М. Х. Вийкмаа

Кафедра зоологии и Центральная медицинская научно-исследовательская лаборатория Тартуского государственного университета

В настоящей работе излагаются некоторые данные об изменениях влагалищного эпителия при органотипической культивации под влиянием эстрогена и витамина А.

Метод культуры органов широко используется при изучении гистогенеза тканей, формирования органов, а также морфологических, физиологических и биохимических характеристик дифференцировки тканей начиная с основополагающей работы Стренджуэйса и Фелла (Strangeways and Fell, 1926). Изучение дифференцировки эпителиальных тканей является в этих работах одной из основных задач. Уже эксперименты Стренджуэйса и Фелла (1926), Н. Г. Хлопина (1932), Мишурского (Miszurski, 1937) и Хэнсона (Hanson, 1950) выяснили, что эмбриональный эпидермис при дифференцировке в культуре кератинизируется. Позднее, при помощи метода часового стекла Фелла и Робисона (Fell and Robison, 1929) или модификаций этого метода (Вольф и Афэн — Wolff et Haffen, 1952; Шэн — Chen, 1954; Шаффер — Shaffer, 1956) получили более полные данные о дифференцировке эпидермиса *in vitro* (Матольчи — Matoltzy, 1960; Пэлк и Фелл — Pelc and Fell, 1960; Уйссельс — Wessels, 1961). Было показано, что и некоторые другие эпителии в культуре становятся плоскими или также кератинизируются (Пэлк — Pelc, 1959, пищевод; Фрэнкс — Franks, 1959; Ласницки — Lasnitzki, 1962, простата; Москона и Карнекас — Moscona and Carnecas, 1959, хориоаллантоидная мембрана).

Фелл и Мелланби (Fell and Mellanby, 1953) нашли, что при добавлении витамина А к среде полностью подавляется кератинизация эмбрионального эпидермиса и последний дифференцируется в сторону секреции слизи, становясь часто реснитчатым. Фелл (1957) показала, что даже уже кератинизированный эпидермис 18-дневного куриного эмбриона способен превращаться в слизистый за счет потенций клеток базального слоя.

Первые попытки эксплантации влагалищного эпителия потерпели неудачу (Эмменс и Лудфорд — Emmens and Ludford, 1940), но Харди с сотрудниками (Харди, Биггерс, Клэрингбоулд — Hardy, Biggers and Claringbold, 1953) доказали, что эстроген ускоряет кератинизацию влагалищного эпителия мышат *in vitro*. Кан (Kahn, 1954) высказал мнение, что кератинизация влагалищного эпителия в нормальной среде вызвана недостатком витамина А в ней, так как прибавление витамина препятствует кератинизации. В более поздней статье он уточняет, что витамин А, хотя и подавляет кератинизацию влагалищного эпителия крысят *in vitro*, но не препятствует ей (Kahn, 1959). Ласнишки (1961) показывает, что при культивации влагалищных эксплантатов мышат сбрасывается оригинальный секреторирующий слизь слой эпителия и за счет дифференцировки клеток возникает кератинизирующий эпителий. Витамин А в культуральной среде сохраняет оригинальный эпителий, тормозит кератинизацию, но не препятствует уплощению новообразованных клеток.

Материал и методика

Материалом для эксплантации служили в наших экспериментах кусочки (1×2 мм) стенки влагалища 1—2-недельных крысят. Культивацию провели методом часового стекла (Fell and Robison, 1929) в модификации Вольфа и Афэна (1952) в несколько измененном виде. Питательной средой служила среда № 199 Моргана на 1% агар-агаре в растворе Эрла (Лафарг — Lasfargues, 1962) с пенициллином и стрептомицином по 100 ед. каждого на 1 мл среды.

Во второй группе опытов к среде прибавляли эстрон в виде масляного раствора с расчетом $2 \mu\text{g}$ гормона на 1 мл среды.

В третьей группе опытов эксплантаты обрабатывались до культивации в масляном растворе витамина А (200 м. ед. витамина на 1 мл раствора) в течение часа. Срок культивации был до 4 суток. Эксплантаты фиксировали смесью Карнуа. Парафиновые срезы толщиной 7μ окрашивали тионином, гематоксилином-эозином, гемалауном Майера и муцикармином или гемалауном Майера и альциановым синим. Провели реакцию ШИК.

Результаты экспериментов

В исходном материале самый верхний из 3—5 слоев эпителия был представлен в виде кубических клеток с непостоянными признаками секреции слизи, под которыми часто находились один или два слоя плоских клеток (рис. 1).

При культивации в нормальной среде в течение первых суток

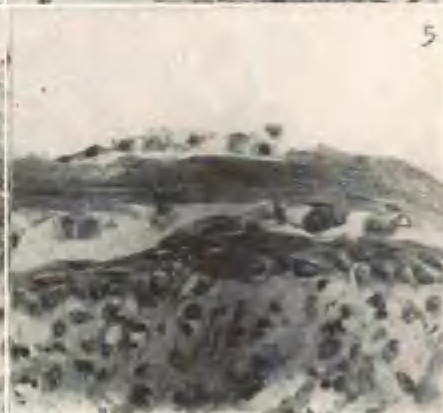
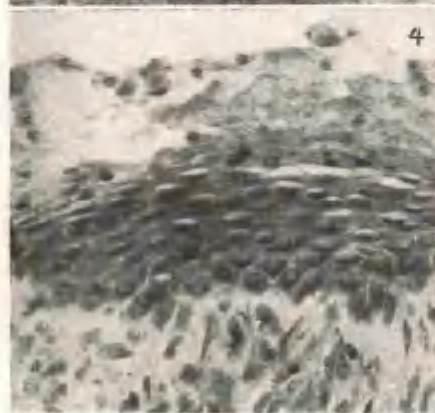
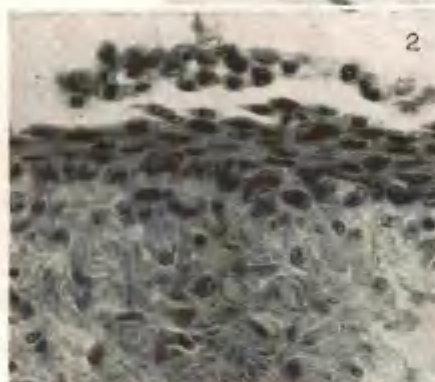


Рис. 1. Влагиальный эпителий 2-нед. крысенка. Карнуа. Гемат.-эоз. $\times 600$.

Рис. 2. Влагиальный эпителий через два дня в культуре в нормальной среде. Карнуа. Гемат.-эоз. $\times 600$.

Рис. 3. Влагиальный эпителий через четыре дня в культуре в нормальной среде. Карнуа. Гемат.-эоз. $\times 600$.

Рис. 4. Влагиальный эпителий через два дня в культуре в среде, содержащей эстрон. Карнуа. Гемат.-эоз. $\times 600$.

Рис. 5. Влагиальный эпителий через четыре дня в культуре в среде, содержащей эстрон. Карнуа. Гемат.-эоз. $\times 600$.

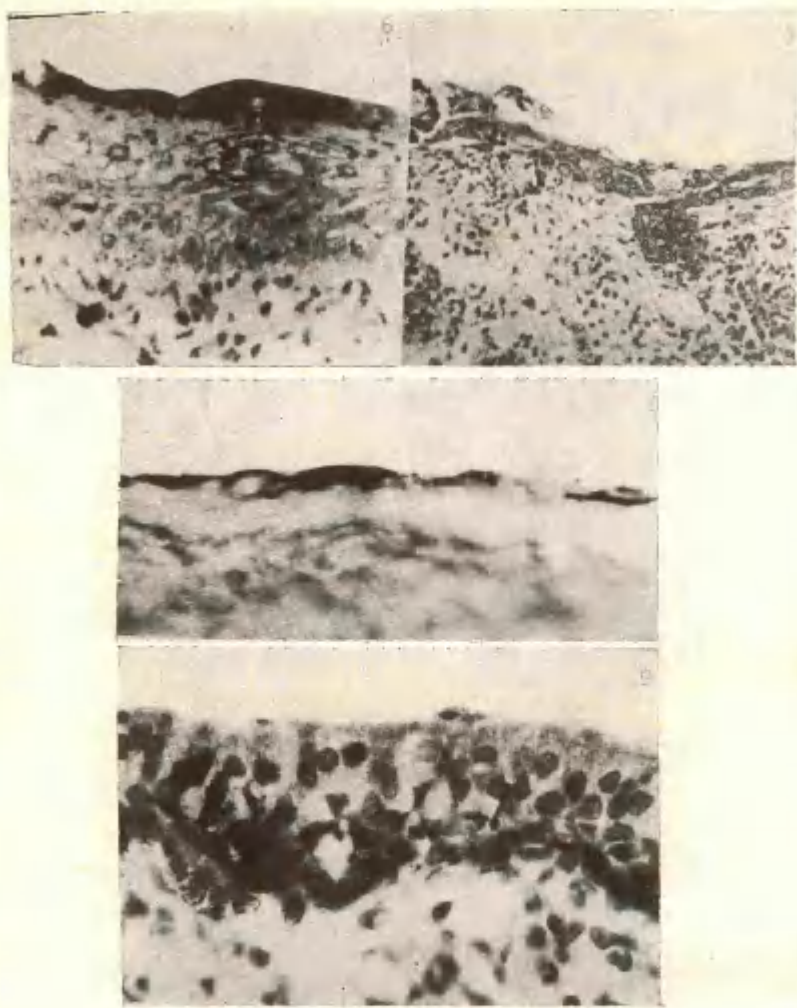


Рис. 6. Влагалищный эпителий, обработанный до культивации витамином А, через два дня в культуре. Карнуа. Гемат.-эоз. $\times 600$.

Рис. 7. Влагалищный эпителий, обработанный до культивации витамином А, через четыре дня в культуре. Карнуа. Альц. синий. $\times 400$.

Рис. 8. Он же. Карнуа. Реакция ШИК. $\times 600$.

Рис. 9. Влагалищный эпителий овариэктомированной крысы, подвергавшейся действию витамина А в течение семи суток. Карнуа. Альц. синий. $\times 600$.

увеличивается количество слоев, в том числе количество слоев плоских клеток под поверхностным слоем. На вторые сутки слущивается поверхностный кубический слой (рис. 2). На третьи сутки эксплантаты полностью покрыты плоским эпителием, в котором наиболее верхние слои иногда частично кератинизированы. Через четверо суток на поверхности эпителия находится довольно толстый ороговевающий слой, который местами начинает слущиваться (рис. 3).

Под влиянием эстрогена описанные выше изменения во влагалищном эпителии ускоряются примерно в два раза. Уже через одни сутки в некоторых эксплантатах эпителиальный пласт становится плоским и на вторые сутки покрывается ороговевающими и слущивающимися клетками (рис. 4). В ходе дальнейшей культивации происходит постепенное ороговение клеток поверхностных слоев и уменьшение толщины эпителия за счет слущивания их (рис. 5).

В эксплантатах, обработанных витамином А, превращение эпителия имеет иной характер. Кубический слой на поверхности эпителия вначале сохраняется и часто сецернирует слизь. За счет пролиферации клеток базального слоя увеличивается толщина эпителия. Через двое суток плоские и кубические поверхностные клетки начинают слущиваться (рис. 6), и на третий день некоторые, а к концу четвертого дня большинство эксплантатов снова покрыты многослойным кубическим эпителием, в котором, однако, отсутствуют слои плоских клеток (рис. 7). Поверхностный слой этого новообразованного эпителия дает положительную реакцию на слизь (рис. 8).

Местами под эпителиальным пластом наблюдаются погружающиеся в собственный слой железообразные скопления клеток. Последние могут возникнуть и в самом эпителии.

Интересно заметить, что в опытах *in vivo* с подкожными инъекциями витамина А (7 дней по 16 000 м. ед. на день) влагалищный эпителий взрослых овариэктомированных крыс становится призматическим и секретирующим слизь (рис. 9).

Обсуждение

Из литературных данных и наших опытов вытекает, что в условиях культивации влагалищный эпителий подвергается кератинизации. Уже Кан (1954) высказал мнение, что это явление может быть обусловлено дефицитом витамина А в среде. К настоящему времени это положение нашло новые подтверждения. Фрэнкс (1959) и Ласниcki (1962) обнаружили, что секреторный эпителий простаты становится гиперпластическим и уплощается в синтетической среде, в которой отсутствует витамин А, но остается, однако, неизменным в содержащей сыворотку среде, которая содержит этот витамин. Ис-

пользование разных синтетических сред также способствует выяснению роли витамина А. Так, Кан (1959) и Ласниcki (1961), которые употребляли соответственно среды CMRL 1066 и BL1, в которых витамин А отсутствует, отмечали кератинизацию влагищного эпителия через два или три дня после начала культивации. В наших опытах кератинизация эпителия в среде Морганa 199, которая содержит немного витамина А, возникла лишь на четвертый день:

Эстрогенный гормон усиливает темп кератинизации, очевидно, путем ускорения метаболических процессов, которые ведут к созреванию кератина.

Эффект витамина А на дифференцировку эпителия объясняется его влиянием на метаболизм серосодержащих аминокислот, которые входят в состав кератина (Pelc and Fell, 1960; Fell 1962 а, б). Это происходит, возможно, посредством гидролитических ферментов, освобожденных из лизосом под влиянием витамина А (Дингл — Dingle, 1961). Одновременно с подавлением синтеза кератина, в эпителиальных клетках активируется, очевидно, генетический механизм, который контролирует синтез слизи. Таким образом, витамин А является веществом, которое направляет дифференциацию эктодермальных эпителиев, определяя, который из потенциально предсуществующих альтернативных путей синтеза активируется в происходящих от базального слоя клетках.

Данные, изложенные здесь, приводят к выводу, что органо-типическая культивация эпителия является хорошим методом для изучения смены клеточных генераций и их дифференцировки в разных направлениях. При этом процессы, происходящие *in vivo*, хорошо моделируемы *in vitro*, что доказывает их значительную автономность по отношению к регуляционным системам организменного уровня.

ЛИТЕРАТУРА

- Chen J. M. The cultivation in fluid medium of organised liver, pancreas and other tissues of foetal rats. *Exptl. Cell Res.*, 7, 518, 1954. — Chlopin N. Über das Wachstum und die Organisationsfähigkeit einiger Epithelgewebe ausserhalb des Organismus. *Z. Krebsforsch.*, 37, 1932. — Dingle J. T. Studies on the mode of action of excess of vitamin A. 3. Release of a bound protease by the action of vitamin A. *Biochem. J.*, 79, 509, 1961. — Emmens C. W. and R. J. Ludford. Action of oestrogens on the female genital tract. *Nature*, 145, 746, 1940. — Fell H. B. The effect of excess vitamin A on cultures of embryonic chicken skin at different stages of differentiation. *Proc. Roy. Soc., B* 146, 242, 1957. — Fell H. B. Some effects of environment on epidermal differentiation. *Brit. J. Dermatol.*, 1, 1, 1962, а. — Fell H. B. The influence of hydrocortisone on the metaplastic action of vitamin A on the epidermis of embryonic chicken skin in organ culture. *J. Embryol. Exptl. Morphol.*, Part 2,

389, 1962. — Fell H. B. and E. Mellanby. Metaplasia produced in cultures of chick ectoderm by high vitamin A. *J. Physiol.*, 119, 470, 1953. — Fell H. B. and R. Robinson. The growth, development and phosphatase activity of embryonic avian femora and limb-buds cultivated in vitro. *Biochem. J.*, 23, 767, 1929. — Franks L. M. A factor in normal human serum that inhibits epithelial growth in organ cultures. *Exptl. Cell Res.*, 17, 579, 1959. — Franks L. M. The growth of mouse prostate during culture in vitro in chemically defined and natural media, and after transplantation in vivo. *Exptl. Cell Res.*, 22, 56, 1961. — Hanson J. Differentiation of mammalian epidermis in tissue culture. *J. Anat.*, 84, 30, 1950. — Hardy M. H., J. D. Biggers and P. J. Claringbold. Vaginal cornification on the mouse produced by oestrogens in vitro. *Nature*, 172, 1196, 1953. — Kahn R. H. Effect of oestrogen and vitamin A on vaginal cornification in tissue culture. *Nature*, 174, 317, 1954. — Kahn R. H. Vaginal keratinization in vitro. *N.-Y. Acad. Sci. Ann.*, Art II, 83, 347, 1959. — Lasfargues E. Y. Concerning the role of insulin in the differentiation and functional activity of mouse mammary tissues. *Exptl. Cell Res.*, 28, 531, 1962. — Lasnitzki I. Action and interaction of radiation, oestrogen and vitamin A on the mouse vagina grown in vitro. In: *La culture organotypique. Associations et dissociations d'organes en culture in vitro*. Ed. Wolff, M. E., Paris, Centre Nat. Rech. Sci., 73, 1961. — Lasnitzki I. Hypervitaminosis A in the mouse prostate gland cultured in chemically defined medium. *Exptl. Cell Res.*, 28, 1962. — Miszurski B. Researches on the keratinization of the epithelium in tissue cultures. *Arch. exp. Zellforsch.*, 20, 122, 1937. — Moscona A. and Z. I. Carnekas. Etiology of keratogenic metaplasia in the chorioallantoic membrane. *Science*, 129, 1743, 1959. — Pelc S. R. The participation of the cell nucleus and its DNA in the formation of keratin. *Exptl. Cell Res.*, Suppl. 7, 97, 1959. — Pelc S. R. and H. B. Fell. The effect of excess vitamin A on the uptake of labelled compounds by embryonic skin in organ culture. *Exptl. Cell Res.*, 19, 99, 1960. — Shaffer B. M. The culture of organs from the embryonic chick on cellulose acetate fabric. *Exptl. Cell Res.*, 11, 244, 1956. — Strangeways T. S. P. and H. B. Fell. Experimental studies of the differentiation of embryonic tissues growing in vivo and in vitro. I The development of the undifferentiated limb-bud. *Proc. Roy. Soc., B*, 99, 340, 1926. — Wessels N. K. An analysis of chick epidermal differentiation in situ and in vitro in chemically defined media. *Develop. Biol.*, 3, 355, 1961. — Wolff E. et K. Haffen. Sur le développement et la différenciation sexuelle des gonades embryonnaires d'oiseau en culture in vitro. *J. Exptl. Zool.*, 119, 381, 1952.

ALTERATIONS OF VAGINAL EPITHELIUM IN SOME EXPERIMENTAL CONDITIONS

M. Viikmaa

Summary

Vaginal explantates of 1—2-week old rats were cultivated in conditions of organotypic cultivation. Wolff's and Haffen's (Wolff et Haffen, 1952) modification of the classical witch glass method with Morgan's synthetic medium 199 was used.

The original epithelium at the moment of the cultivation was 3—5-layered with a layer of cubical cells on the surface and with 1—2 layers of flattened cells under it.

In the normal medium (1 per cent agar in Earle solution, and Morgan's synthetic medium in equal portions) there occurs the desquamation of the superficial cubical cell layer, followed by keratinization of the lower flattened layers of the epithelium in 4 days.

The addition of oestrone (2μ g/ml) to the medium accelerates the keratinization of the epithelium about two-fold.

The incubation of the explantates before cultivation in a highly concentrated vitamin A solution (200 i. u./ml) for an hour suppresses the keratinization of the epithelium. The latter becomes a many-layered cubical epithelium after the upper flattened cells are shed down, and after four days shows in many of the uppermost cells a positive reaction to the mucin (PAS, alcian blue).

СТРУКТУРА ПЕРВИЧНЫХ МЕЗОТЕЛИОМ В СВЯЗИ С ВОПРОСОМ О ГИСТОБЛАСТИЧЕСКИХ ПОТЕНЦИЯХ ЦЕЛОМИЧЕСКОГО ЭПИТЕЛИЯ

А. Г. Бобков

Кафедра патологической анатомии 1-го Ленинградского Медицинского
института имени акад. И. П. Павлова

Тканевая природа и объем гистогенетических потенциалов мезотелия, помимо их теоретического значения в проблеме тканевой специфичности, имеют практическое значение при оценке патогистологических изменений серозных оболочек, прежде всего при воспалении и опухолях.

Относительно природы мезотелия в литературе издавна существуют две основные точки зрения. Многие относят его к эпителиальным тканям (А. А. Колосов, Н. Г. Хлопин и представители его школы, И. И. Дорохов, А. В. Аникин, Brunn, Mönckeberg и др.). Некоторые сближают мезотелий с соединительной тканью (Schott, Weidenreich, Marchand и др.). А. А. Максимов обращает внимание на то, что мезотелий, как и мезенхима, является дериватом выстилающей целом мезодермы. Уплощаясь, он приобретает вид однослойного плоского эпителия, но при изменившихся физиологических и особенно патологических условиях проявляет свойства то эпителиальных, то соединительно-тканых клеток как в составе целого организма, так и в тканевых культурах. По существу такого же мнения придерживаются Н. Я. Кузнецовский, Brandenburg.

Н. Г. Хлопин, В. П. Михайлов, С. И. Щелкунов считают мезотелий специализированной эпителиальной тканью, относящейся к целодермальному тканевому типу и не способной к превращению в соединительную ткань. Однако это заключение основано главным образом на изучении мезотелия в условиях эксплантации, регенерации и воспаления. Мезотелий в условиях опухолевого роста Н. Г. Хлопиным не исследовался. Между тем, как справедливо замечает В. П. Михайлов, онкология может служить методом эмбриологического анализа.

Мезотелиомы серозных оболочек могут иметь карциноматоз-

ную и саркоматозную структуру. Так, Н. Я. Кузнецовский при злокачественных мезотелиомах описывает структуру, напоминающую рак, с ясно выраженным разделением на паренхиму и строму и, наряду с ней, диффузный рост опухолевых клеток, между которыми обнаруживалось основное вещество. Д. И. Головин выделил в мезотелиомах 4 типа гистологических структур, обратив внимание на сходство их со структурами, возникающими при воспалительной пролиферации мезотелия. Askergran разделил различные виды мезотелиом на фиброзные и тубулярные формы. Считая, что клетки мезотелия секретируют гиалуроновую кислоту, он однако не встречал в мезотелиомах «эпителиальный муцин», красящийся муцикармином. Bruns и Voigt отмечают полиморфизм мезотелиом. Они приводят гистогенетическую схему мезодермальных опухолей, считая, что мезотелий, мезенхима и эндотелий развиваются из единого мезодермального источника. Brandenburg полагает, что разнообразие структур в мезотелиомах является признаком мультипотентности мезотелия.

Как следует из этих сообщений, мезотелий при опухолевом росте может иметь более широкий диапазон превращений, чем при регенерации или воспалении, проявляя при этом как эпителиальные, так и фибропластические свойства. Это можно объяснить тем, что при опухолевой катаплазии мезотелий в той или иной степени утрачивает свою специализацию и органоспецифическую дифференцировку, приобретая некоторые эмбриональные свойства, характерные для целомического эпителия с более широкими возможностями отклонений вторичной дифференцировки.

В настоящее время, после работ Masson, Riopelle и Simard (1942) и Evans (1943), к доброкачественным мезотелиомам стали относить своеобразные редкие опухоли, описанные также под различными другими названиями, из которых более распространен термин «аденоматоидная опухоль» (Golden и Ash, 1945). Они встречаются в области гениталиев, у мужчин — в придатке яичка, оболочках яичка и семенного канатика, у женщин — в фаллопиевых трубах и матке возле серозного покрова. Из литературы нами собрано более 160 наблюдений таких опухолей, относящихся к придатку яичка.

Наш собственный материал составляет 19 случаев, из них 6 с гистогенетическим анализом уже описаны (А. Г. Бобков). При гистологическом исследовании названных опухолей обращает внимание их органоидное строение и разнообразие структур. В большинстве из них можно встретить 4 вида тканей: эпителий, соединительнотканную строму, пучки гладкомышечных волокон и лимфаденоидную ткань.

Эпителий образует выстилку щелевидных или овальных полостей, а также солидные пласты. Выстилка полостей состоит обычно из одного слоя сильно уплощенных клеток, напоминаю-

щих эндотелий (рис. 1). Иногда клетки имеют кубическую или призматическую форму, и полости при этом приобретают железистый вид. Цитоплазма клеток светлая, часто содержит вакуоли. Встречаются также внеклеточные вакуоли, возникающие на месте дегенерирующих клеток. При сильно выраженной вакуолизации образуются сложные сетевидные структуры. Ядра эпителиальных клеток овальные или вытянутые, обычно светлые, с отчетливо различимым ядрышком. Среди них встречаются темные ядра с неразличимой структурой. Некоторые авторы обнаруживали на свободной поверхности клеток щеточную кайму (Bonnard и Berge, Cameron, Fajers) и центральную ресничку (Fajers, Mylius, Longo и соавторы).

В препаратах просвет полостей и вакуоли часто представляются пустыми, но иногда при окраске муцикармином в них выявляются ярко-красные нити и зерна слизи или бледно-розовое содержимое (рис. 2). По данным Lee и соавторов материал, содержащийся в вакуолях и полостях, непостоянно окрашивается муцикармином и не дает красочных реакций на жир и гликоген.

В солидных комплексах опухолевых клеток также часто наблюдаются вакуоли. Клетки имеют неправильную форму, богаты светлой цитоплазмой, содержат пузырьковидное ядро. Среди них встречаются узкие темные клетки.

Строма опухолей образует обычно тонкие прослойки, в состав которых входят аргирофильные и коллагеновые волокна, а также умеренное количество сосудов.

Пучки гладких мышечных волокон чаще встречаются в периферических отделах опухоли. Они четко очерчены и имеют различное направление. Изредка встречаются опухоли с преобладанием гладкомышечной ткани, между пучками которой располагаются узкие эпителиальные тяжи и трубочки.

Лимфоцитарные скопления могут иметь характер лимфатических фолликулов с ретикулярной основой (рис. 3). Кроме того, встречаются диффузные лимфоцитарные инфильтраты с примесью плазматических клеток и полибластов.

Вопреки общепринятому мнению о доброкачественности аденоматоидных опухолей, в 3 случаях мы наблюдали признаки малигнизации.

Трактовка гистогенеза аденоматоидных опухолей представляет значительные трудности. Этот вопрос рассмотрен в упомянутой выше нашей статье, где приведена и соответствующая литература. Коротко резюмируя, следует отметить, что существуют три основные точки зрения. Часть авторов относит эти опухоли в группу эндотелиальных. Другие так или иначе считают их эпителиальными, возникающими из вольфова или мюллера эпителия, или не уточняют источник происхождения эпителия. По мнению третьих, опухоль возникает из мезотелия.

Мы полагаем, что основная клеточная структура опухоли является эпителиальной. Об этом свидетельствует образование железистых полостей и солидных клеточных пластов, способных вырабатывать слизистый материал, а также описанные некоторыми авторами щеточная кайма и реснички на свободной поверхности клеток. При этом нет никаких оснований относить опухолевый эпителий к производным первичной почки, вольфова или мюллерова канала. Вместе с тем, нельзя не обратить внимание на близкое расположение опухолей возле серозной оболочки и на прямую связь опухолевого эпителия с мезотелием, описанную несколькими авторами. Эта связь не доказывает возникновение опухолей из мезотелия, но должна рассматриваться как результат происхождения обоих из общего источника — примитивного целомического эпителия, который обладает широкими гистобластическими потенциями, может дифференцироваться в мезотелий, опухолевый эпителий и служить источником производных мезенхимы — гладкомышечных волокон и ретикулярной лимфаденоидной ткани.

Вероятно, аденоматоидные опухоли возникают из эмбриональных дистопий целомического эпителия в период закладки половых органов, т. е. до того, как целомический эпителий дифференцируется в мезотелий. С таким выводом согласуется описанная выше органоидная структура опухоли и локализация только в пределах половой сферы. При этом клинические наблюдения позволяют думать, что даже при появлении симптомов опухоли в зрелом возрасте не исключается ее закладка в качестве порока развития в эмбриональном периоде, а изредка опухоль обнаруживается уже при рождении ребенка (Burgos и Mayoock).

Для суждения о гистогенетических потенциях мезотелия, а также для оценки структур аденоматоидных опухолей могло бы оказаться ценным воспроизведение экспериментальных мезотелиом. Однако в литературе мы не нашли таких сообщений.

Изучая опухоли придатка яичка, развившиеся у белых крыс после введения канцерогенных углеводов, мы встретились с одним случаем злокачественной мезотелиомы. Крыса погибла на 374 день после введения 3,5 мг. 9,10-диметил-1,2-бензантрацена в парафин-ланолиновой пилуле в хвостовую часть придатка левого яичка. Опухоль размерами $3,5 \times 2 \times 2$ см прорастала в придаток яичка и дала множественные метастазы по брюшине и в лимфатические узлы.

При гистологическом исследовании на поверхности придатка яичка найден толстый пласт опухолевой ткани, местами прорастающий в толщу органа. По краю пласта обнаружены сосочковые структуры, выстланные клетками кубической формы с базофильной цитоплазмой и круглым темным ядром (рис. 4). При окраске по Браше в цитоплазме выявляется большое коли-

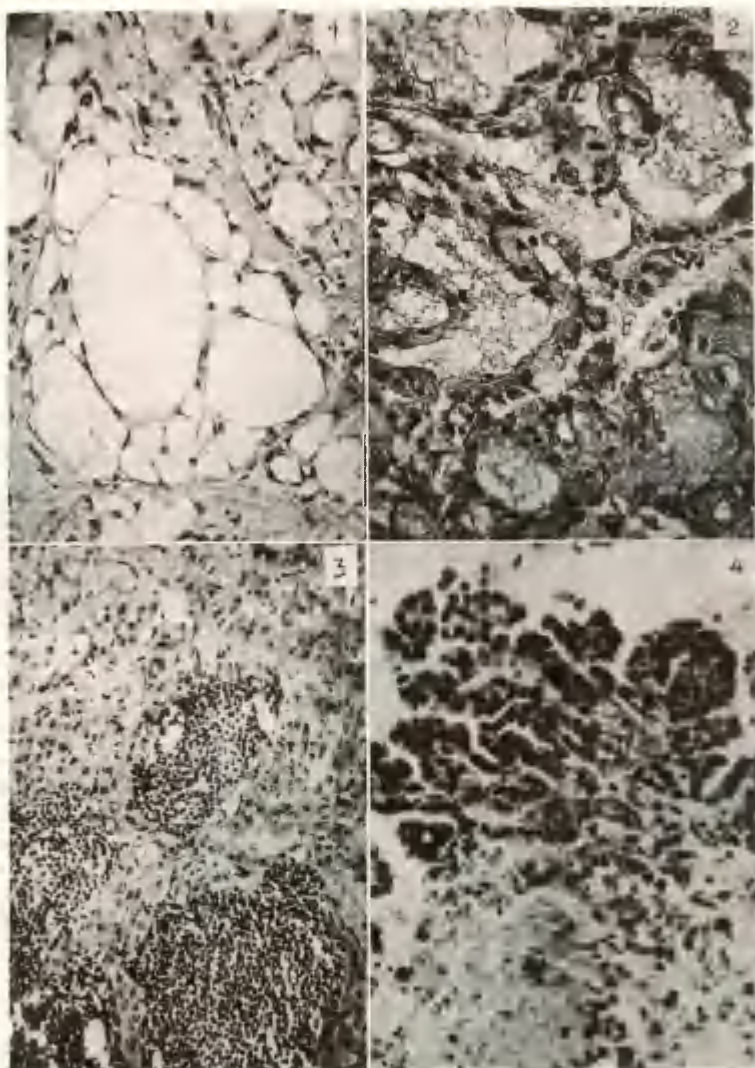


Рис. 1—3. Аденоматоидные опухоли человека.

Рис. 1. Мелкополостная структура опухоли, напоминающая лимфангиому; вакуолизация эпителия. Окраска по ван Гизону, объектив 20, окуляр 15, увеличение 300.

Рис. 2. Железистая структура опухоли; слизистое вещество в полостях. Окраска муцикармином и гематоксилином, объектив 20, окуляр 15, увеличение 300.

Рис. 3. Опухоль солидной структуры с мелкими вакуолями; лимфоцитарные фолликулы. Окраска по Гейденгайну, объектив 20, окуляр 10, увеличение 200.

Рис. 4—6. Экспериментальная злокачественная мезотелиома белой крысы.

Рис. 4. Сосочковая структура из темных клеток на поверхности опухолевого пласта. Окраска по ван Гизону, объектив 20, окуляр 20, увеличение 400.

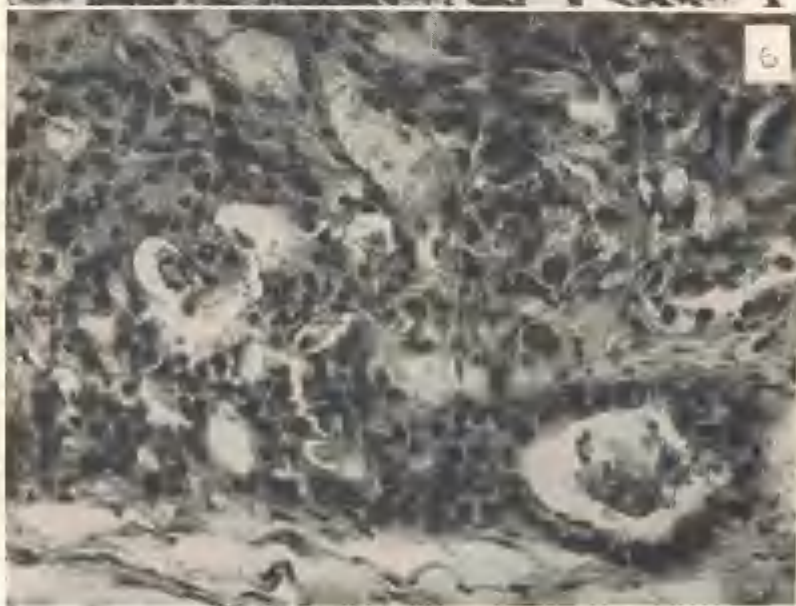


Рис. 5. Мелкополостная структура, напоминающая лимфангиому; аргирофильные волокна в стенках полостей. Импрегнация серебром по Футу и гематоксилин, объектив 20, окуляр 20, увеличение 400.

Рис. 6. Железистые полости, содержащие слизистые массы. Окраска мучикармином и гематоксилином, объектив 20, окуляр 20, увеличение 400.

чество РНК. Ядра богаты ДНК, интенсивно окрашиваются по Фельгену и галлоцианином. Клетки, образующие сосочки, непосредственно связаны с мезотелием и непрерывным слоем переходят в выстилку серозы, состоящую из одного ряда набухших мезотелиальных клеток.

В сосочковых структурах, по мере удаления от поверхности в толщу опухоли, клетки приобретают неправильную форму, становятся светлее и беднее нуклеиновыми кислотами. Связь между клетками разрыхляется, выявляются отростки цитоплазмы. По Маллори цитоплазма части клеток красится в синеватые тона, и эктоплазматическая часть переходит в синие волокна. При импрегнации серебром по Футу между отдельными клетками и мелкими клеточными группами выявляется сеть аргирофильных волокон, которые окрашиваются также при реакции ШИК. Более толстые коллагеновые волокна красятся в красный цвет по ван Гизону. Кое-где отмечается их слабая муцикарминифилия.

Большая часть опухолевой ткани состоит из клеток неправильной отростчатой или вытянутой формы, расположенных то более компактно, то рыхло. Преобладают светлые клетки, бедные РНК, но наиболее узкие клетки содержат ее в значительной концентрации. Ядра различной величины, округлые или вытянутые, с различным, но чаще небольшим или умеренным содержанием ДНК. В них видно одно, иногда два мелких ядрышка. В некоторых клетках ядрышки крупны. Встречаются гигантские клетки с несколькими ядрами и многочисленные митозы. Изредка опухолевые клетки складываются в рыхлые пучки саркомоподобного вида. Местами клетки интимно переплетаются с нежными аргирофильными и коллагеновыми ШИК-положительными волокнами. Некоторые волокна более толстые и грубые.

Образование волокон наблюдается также в опухолевой ткани, находящейся в просвете расширенных лимфатических сосудов. Как известно, метастазирование по сосудам свойственно паренхиматозным элементам опухолей. Следовательно, образование волокон в сосудах осуществляется за счет самих опухолевых клеток, а не за счет стромы.

Такое же строение опухолевая ткань сохраняет в метастазах.

В первичном узле, кроме описанных, обнаруживаются другие структуры.

В некоторых участках опухолевая ткань напоминает лимфангиому (рис. 5). При этом выявляются многочисленные полости, окаймленные уплощенными клетками, причем в области расположения ядра тело клетки часто образует выпуклость. Клетки имеют небольшое количество светлой цитоплазмы. Ядро овальное или вытянутое с умеренным, иногда значительным содержанием ДНК. Нередко мелкие полости окаймлены клетками неправильной формы, имеющими отростки цитоплазмы. Послед-

ние могут достигать большой длины и перекидываться через просвет в виде тонких цитоплазматических мостиков. Описанные структуры придают опухолевой ткани мелкополостное «сосудистое» и сетчатое строение. В просвете полостей ШИК-положительного материала не найдено.

Местами опухоль образует полости железистого характера. При этом мелкие ветвящиеся трубочки формируются среди основной массы клеток, имеющих вытянутую или неправильную форму. Трубочки окаймлены одним слоем компактно расположенных кубических, невысоких призматических или слегка уплощенных клеток эпителиального типа. Цитоплазма их несколько темнее, чем у окружающих клеток, и довольно богата РНК. Ядро относительно крупное, округлое, с умеренным или значительным содержанием ДНК. В более светлых ядрах отчетливо различимо ядрышко.

В просвете трубочек обнаруживается слизистое содержимое, интенсивно окрашивающееся при ШИК-реакции и муцикармином (рис. 6). Реакция ШИК не изменяется после предварительной обработки срезов амилазой слюны. Такую же окраску дает апикальная часть клеток на границе с просветом трубочек.

Снаружи от слоя клеток, окаймляющих трубочки, лежат тонкие прослойки соединительной ткани с аргирофильными и коллагеновыми волокнами, но местами трубочки без ограничения стромой переходят в рыхлые опухолевые пласты.

Выводы

1. Специализация мезотелия, как эпителия целодермального типа, относительна: малигнизированный мезотелий может образовывать как эпителиальные, так и соединительнотканые структуры.

2. В условиях экспериментальной малигнизации мезотелий может формировать папилломатозные разрастания, рыхлые пласты, мелкополостные структуры (напоминающие лимфангиоматозные) и железистые структуры, содержащие слизистый, ШИК-положительный, красящийся муцикармином материал. Опухолевые клетки проявляют также фибропластические свойства, выражающиеся в образовании аргирофильных и коллагеновых волокон.

3. При сравнении экспериментальной злокачественной мезотелиомы эпидидимиса с аденоматозными опухолями человека обнаруживается некоторое морфологическое сходство, выражающееся в образовании склонных к разрыхлению клеточных пластов, мелкополостных «лимфангиоматозных» структур, железистых полостей и выработке слизистого материала.

4. Анализ морфологических особенностей в сопоставлении с некоторыми клиническими данными позволяет считать адено-

матоидные опухоли гениталиев у человека развивающимися не из дифференцированного мезотелия, а из эмбрионального целомического эпителия. Названные опухоли, по-видимому, имеют тератоидный характер и не являются истинными мезотелиомами.

ЛИТЕРАТУРА

Аникин А. В. Мезотелий, его морфология, функция и регенерация. Автореферат докт. дисс., 1-й Московский мед. инст. им. И. М. Сеченова, М., 1959. Бобков А. Г. О гистогенезе аденоматоидных опухолей (мезотелиом) эпидидимиса. Арх. анат., гист. и эмбр., 1962, 43, 7, 60—67. Головин Д. И. О гистогенезе первичных опухолей серозных оболочек. Арх. патол., 1953, 15, 2, 38—44. Дорохов И. И. Мезотелий париетальной брюшины человека и его изменения при некоторых заболеваниях. Автореферат канд. дисс., Воен.-мед. акад. им. С. М. Кирова, Л., 1951. Кузнецовский Н. Я. О гистологических особенностях злокачественных опухолей из покровных клеток (мезотелия) серозных полостей. Вестн. хир. и погран. обл., 1929, 16/17, 48/49, 81—92. Михайлов В. П. Гистогенез эпителиальных опухолей яичника, М., 1949. Хлопин Н. Г. Превращения мезотелия серозных оболочек при экспериментальных условиях и вопрос об его тканевой специфичности. Бюлл. ВИАМ, 1935, 3, 5—7. Хлопин Н. Г. О покровных клетках серозных оболочек и их положении в системе гистологических структур. Арх. анат., гист. и эмбр., 1937, 16, 3, 411—459. Хлопин Н. Г. Общебиологические и экспериментальные основы гистологии, 1946. Щелкунов С. И. Экспериментально-гистологическое изучение развития спаек брюшины. Труды Ленингр. Сан.-гиг. мед. инст., Л., 1953, 16, 33—46.

Ackerman, L. V. Tumors of the peritoneum. Atlas of tumor pathology, Washington, 1954, Sect. 6, Fasc. 23—24, p. 97—136. Bonnard, A. et Berge, Ch. Le mesothéliome bénin de l'épididyme. Bull. Assoc. franç. canc., 1948, 35, 3, 306—311. Brandenburg, W. Die Multipotenz des Mesothels (Metamorphose und Mimese der Zelle). Jena, 1953. Brunn, M. Ueber die Entzündung seröser Häute mit besonderer Berücksichtigung der Rolle der Serosa Deckzellen. Beitr. z. path. Anat., 1901, 30, 417—456. Bruns, G. und Voigt, G. Betrachtungen zur pathologischen Anatomie der Endotheliome (am Beispiel eines malignen Endothelioms der Herzklappe). Zbl. Path., 1950, 86, 2, 75—92. Burros, H. M. and Mayock, P. P. Adenomatoid tumor of the epididymis; report of a case in a newborn. J. Urol., 1950, 63, 4, 712—713. Cameron, H. M. Adenoma of the epididymis. J. Path. Bact., 1954, 68, 1, 293—295. Evans, N. Mesotheliomas of the uterine and tubal serosa and the tunica vaginalis testis. Amer. J. Path., 1943, 19, 3, 461—471. Fajers, C. M. Mesotheliomas of the genital tract. Acta Path. Microbiol. Scandinav., 1949, 26, 1—23. Golden, A. and Ash, J. E. Adenomatoid tumors of the genital tract. Amer. J. Path., 1945, 21, 1, 63—79. Kolossow, A. A. Ueber die Struktur des Pleuroperitoneal- und Gefäßepithels (Endothels). Arch. f. mikr. Anat., 1893, 42, 318—383. Lee, M. J., Dockerty, M. B., Thompson, G. J. and Waugh, J. M., Benign mesotheliomas (adenomatoid tumors) of the genital tract. Surg., Gynec., Obst., 1950, 91, 2, 221—231. Longo, V. J., McDonald, J. R. Thompson, G. J. Primary neoplasms of the epididymis; special reference to adenomatoid tumors. J. A. M. A., 1951, 147, 10, 937—491. Marchand, F. Die Veränderungen der peritonealen Deckzellen nach Einführung kleiner Fremdkörper. Beitr. z. path. Anat., 1921, 69, 1—26. Masson, P., Riopelle, J. L. et Simard, L. C. Le mesothéliome bénin de la sphère génitale. Rev. Canad. Biol., 1942, 1, 720—751. Maximow, A. Ueber das Mesothel (Deckzellen der serösen Häute) und die Zellen der serösen Exsudate. Arch. exp. Zellforsch., 1927, 4, 1, 1—42. Maximow, A. Die Deckzellen

oder Mesothelzellen. In Handb. d. mikr. Anat. von W. Möllendorf, Berlin, 1927, Bd. 2, T. I., S. 291—297. Mönckeberg, J. G. Ueber das Verhalten des Pleuroperitonealepithels bei der Einheilung von Fremdkörpern. Beitr. z. path. Anat., 1903, 34, 3, 489—531. Mylius, E. A. Mesothéliome bénin de la sphère génitale. Acta chir. Scandinav., 1952, 104, 1, 201—205. Schott, E. Morphologische und experimentelle Untersuchungen über die Bedeutung und Herkunft der Zellender serösen Höhlen und der sog. Makrophagen. Arch. f. mikr. Anat., 1909, 74, 1, 143—216. Weidenreich, F. Die Leucocyten und verwandte Zellformen. Ergebn. d. Anat. u. Entwicklungsgesch., Wiesbaden, 1911, Bd. 19, 2. Hälfte, S. 527—892.

THE STRUCTURE OF PRIMARY MESOTHELIOMAS IN CONNECTION WITH THE HISTOBLASTIC PROPERTIES OF CELOMIC EPITHELIUM

A. G. Bobkov

Summary

The specialization of the mesothelium, owing to its celodermic nature is a relative one. The malignant mesothelium is able to form an epithelial as well as connective tissue structures. After malignization, induced experimentally, the mesothelium presents papillomatous proliferation, loose membranes, microcavitary structures resembling lymphangiomatous ones and adenomatous formation containing mucine. The blastomatous cells also show fibroblastic properties. As the experimental malignant ones reveal a certain similarity with adenomatoid human mesotheliomas. The study of morphological peculiarities corroborated with some clinical data convinces us that the adenomatoid genital blastomas originate from embryonic celomic epithelium, being antecedents of the differentiation of the latter into mesothelium. For this reason, the human adenomatoid blastomas having a teratoid character, are not true mesotheliomas.

О КЛЕТОЧНЫХ ТИПАХ ПЕРВИЧНЫХ ТКАНЕВЫХ КУЛЬТУР ПОЧКИ

С. А. Вероман

Центральная медицинская научно-исследовательская лаборатория Тартуского государственного университета

Первичные трипсинизированные культуры почек широко используются в вирусологии. Но по классификации клеточных типов первичных трипсинизированных культур в литературе имеются значительные расхождения. В. Г. Заславский (1959, 1960) различает в почечной культуре обезьяны три типа клеток: веретенообразные, плоские и гнездные по описательным признакам. По таким же признакам различают С. Я. Залкинд и Л. Г. Степанова (1959) округлые и отростчатые клетки в культуре почек обезьяны, а Я. Е. Хесин и соавторы (1961, 1963) крупные синцитиальные, мелкие синцитиальные и островковые клетки в культуре почек коровьего эмбриона. Эти данные трудно сопоставимы, причем совершенно открытым остается вопрос о тканевой принадлежности этих клеточных типов.

В настоящей работе описаны результаты культивирования почек крольчат, щенков и плодов человека, овцы, белой крысы, а также куриных эмбрионов. Почки после удаления капсулы, лоханки и части мозгового вещества обрабатывали смесью трипсина с панкреатином. Изолированные клетки высеивали вместе с кусочками ткани, которые представляли собой изолированные клубочки или обрывки почечных трубочек с перитубулярной соединительной тканью. По этим кусочкам оказалось возможным определение тканевой принадлежности зон роста вокруг них.

Культуры, растущие на покровных стеклах, фиксировали в растворах Максимова, Бэкера и в формалине. Обзорные препараты окрашивали гематоксилином Гейденгайна, активность кислотной фосфатазы определили по Гомори в модификации Гольт, щелочной фосфатазы по Гомори и сукциндегидрогеназы по Нахласу с нитро-СТ. Зафиксированные формалином культуры импрегнировали по В. Я. Карупу.

Почечные клетки растут в виде нескольких клеточных типов, которые в основном сопоставимы с типами, описанными В. Г. Заславским (1960). Поскольку нам удалось определить тканевую специфику этих типов, кажется более целесообразным назвать их не по описательным признакам, как это сделано В. Г. Заславским, а на основе тканевой принадлежности.

1. Гломерулярные клетки (гнездные по В. Г. Заславскому, островковые по Я. Е. Хесину и сотр.) растут в виде гнезд или островков среди других клеток. Эти клетки более мелкие, веретенообразные или полигональные, ядра круглые или овальные. Околоядерная цитоплазма окрашивается интенсивно гематоксилином Гейденгайна. По нашим морфологическим наблюдениям рост описанных клеток получает начало от почечных клубочков (рис. 1), что соответствует данным Вейлера (Weiler, 1959), полученным иммунологическим методом. Происходят ли гломерулярные клетки от эпителиоцитов или эндотелия, требует дальнейшего исследования.

2. Тубулярные клетки растут в виде более крупных колоний с неправильными очертаниями. Эти клетки, в зависимости от вида животного, имеют разную форму. У кролика колонии более мелкие, клетки полигональные с вогнутыми краями; у человека они представлены в виде неправильных ромбов или коротких плоских веретен (рис. 2). У крысы и курицы тубулярные клетки полигональные с прямолинейными границами (рис. 3). Ядра этих клеток светлые и более крупные, чем у гломерулярных клеток; цитоплазма окрашивается слабее гематоксилином Гейденгайна. Эти клетки активно фагоцитируют попадавшие в культуру эритроциты (рис. 2). Так называемые эозинофильные включения, описанные А. И. Дробышевской и В. П. Михайловым (1957) и В. Г. Заславским (1959), объясняются эритрофагоцитозом. Тубулярное происхождение этого клеточного типа подтверждается тем, что подобные же мембраны вырастают из фрагментов почечных трубочек (рис. 4). То же было доказано Вейлером (1959) иммунологическим методом. Дальнейшей задачей является выяснение отличий роста отдельных элементов нефрона и собирательной системы.

3. Фибробласты соединяют колонии гломерулярных и тубулярных клеток. Они имеют веретенообразно-звездчатую форму. Больше всего они встречаются в культурах почек кролика, щенка, белой крысы и овцы. В старых культурах фибробласты дегенерируют позже остальных клеточных типов.

Несмотря на фибробластоподобную форму этих клеток, прежние авторы высказывались неопределенно на счет их происхождения. Эти сомнения понятны, так как в густых мембранах фибробласты по данным К. И. Пыльдвере (1963) принимают более эпителиоподобный вид. Нам удалось импрегнацией серебром выявить на этих клетках аргирофильные волокна, что дока-

зывает происхождение описываемых клеток от интерстициальной соединительной ткани почки (рис. 5). В отличие от фибробластов кожи и межмышечной ткани в трипсинизированных культурах почки образование аргирофильных волокон менее выражено.

Различные по морфологии клетки отличаются друг от друга и гистохимически.

Активность кислой фосфатазы при использованной нами методике локализуется исключительно в цитоплазме клеток в виде гранул различной величины, и не отмечается в ядрах, как это обнаружил В. Г. Заславский (1961). В цитоплазме около ядра эти гранулы более крупные и тесно расположены; в периферии клетки они более мелкие и их меньше.

В гломерулярных клетках активность кислой фосфатазы более высокая уже в молодых культурах (рис. 6). В тубулярных клетках и в фибробластах активность кислой фосфатазы ниже. По мере старения культуры активность кислой фосфатазы постепенно возрастает вплоть до гибели клеток из-за автолиза. Это происходит прежде в гломерулярных, затем в тубулярных клетках. Наиболее жизнеспособными в культурах являются фибробласты, причем активность кислой фосфатазы в них по мере старения культуры заметно возрастает.

Активность щелочной фосфатазы выявляется на поверхности клеток. В более старых культурах обнаруживаются также в цитоплазме редкие гранулы с активностью щелочной фосфатазы. По сравнению с кислой фосфатазой активность щелочной фосфатазы более низкая. Это соответствует данным Альбрехта и соавторов (Albrecht, Mittelstrass, Sauthoff, 1958), полученным биохимическим методом в первичных культурах почки обезьян.

В гломерулярных клетках активность щелочной фосфатазы немного выше, чем в остальных клеточных типах (рис. 7). По мере старения культуры активность щелочной фосфатазы в гломерулярных клетках возрастает. Границы гломерулярных клеток, где активность более высокая, становятся хорошо видимыми. Активность щелочной фосфатазы различается в отдельных клеточных типах, как это обнаружено в работах В. Г. Заславского (1960, 1961 а).

Активность сукциндегидрогеназы выявляется в цитоплазме клеток в виде круглых, более-менее равномерно расположенных гранул. Более высокая активность обнаруживается в тубулярных и более низкая в гломерулярных клетках. В фибробластах активность сукциндегидрогеназы является промежуточной по сравнению с гломерулярными и тубулярными клетками.

В. Г. Заславским (1961 а), а также В. Г. Заславским и А. М. Амченковой (1961) указано, что в первичных культурах почки в первые дни культивирования происходит обратимое исчезновение активности щелочной фосфатазы и сукциндегидро-

геназы. В наших опытах мы такого явления не наблюдали. Активность щелочной фосфатазы и сукциндегидрогеназы выявляется в течение всего цикла жизни культуры; она более низка в первые дни культивирования и возрастает по мере старения культуры.

Таким образом, разные клеточные элементы почки сохраняют в тканевых культурах свою тканевую и видовую специфичность.

ЛИТЕРАТУРА

Дробышевская А. И., В. П. Михайлов. Цитопатогенные изменения в однослойной культуре почечной ткани обезьян под влиянием вируса полиомиелита. Ежегодник ИЭМ АМН СССР, 438, за 1956 год, 1957. — Залкинд С. Я., Л. Г. Степанова. Сравнительно-цитологический анализ клеток культуры тканей в норме и при воздействии вируса полиомиелита. Бюлл. эксп. биол. и мед., 24, 6, 1959. — Заславский В. Г. Цитологическое и цитохимическое изучение культуры почечных клеток обезьян. В кн.: Научные основы производства полиомиелитной вакцины, 385, М., 1959. — Заславский В. Г. Цитологическое и цитохимическое изучение культуры почечных клеток обезьян. Acta virologica (русское издание), 4, 124, 1960. — Заславский В. Г. Цитохимическое определение активности некоторых ферментов в клетках первичных и перевиваемых тканевых культур. В кн.: Вирусные инфекции и противовирусные препараты. М., 1961. — Заславский В. Г. Сравнительное изучение активности сукциндегидразы и щелочной фосфатазы в клетках первично эксплантационных и перевиваемых тканевых культур. Бюлл. эксп. биол. и мед., 2, 107, 1961 а. — Заславский В. Г., А. М. Амченкова. Цитохимическое изучение активности сукциндегидразы в культивируемых вне организма клетках. Бюлл. эксп. биол. и мед., 1, 91, 1961. — Пыльдвер К. И. О росте и превращении так называемой «кожномышечной ткани» в однослойной трипсинизированной культуре. Арх. анат., гистол. и эмбр., XLV, 10, 20, 1963. — Хесин Я. Е., Ф. Б. Сушков, М. И. Митин. Однослойная культура клеток почек коровьего эмбриона в нормальных условиях культивирования и при заражении вирусом оспенной вакцины. В кн.: Вирусные инфекции и противовирусные препараты. 280, М., 1961. — Хесин Я. Е., Ф. Б. Сушков, М. И. Митин. Размеры ядер клеток в культурах ткани. Цитол., 5, 1, 44, 1963. —

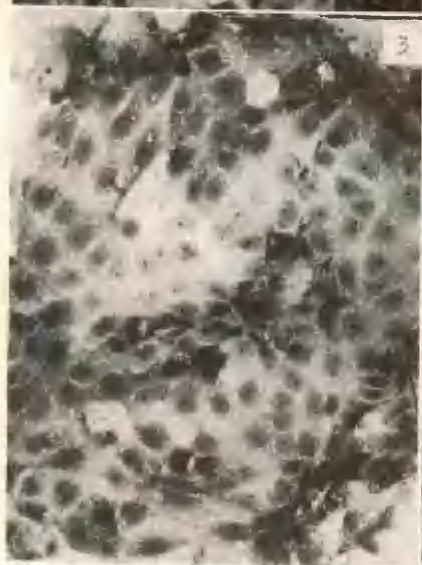
Albrecht W., H. K. Mittelstrass, R. Sauthoff. Das Verhalten der alkalischen und sauren Phosphatase in Zellkulturen aus Affennieren nach Infektion mit ECHO-Virus Serotyp 9 und Poliovirus hominis Typ 1. Zeitschr. für Naturforschg. B, 13b, H. 2, 1958. — Weiler E. A cellular change in hamster kidney cultures: Loss of tissue-specific antigens. Exptl. Cell Res., 244, suppl. 7, 1959.

Рис. 1. Культура почки 7-месячного плода человека через семь дней после посева. Колонии гломерулярных клеток среди тубулярных клеток и фибробластов. Максимов, гематоксин Гейденгайна. Об. 10, ок. 20.

Рис. 2. Культура почки 7-месячного плода человека через семь дней после посева. Фагоцитированные эритроциты в тубулярных клетках. Максимов, гематоксин Гейденгайна. Об. 10, ок. 40.

Рис. 3. Культура почки плодов крысы через два дня после посева. Колонии тубулярных клеток. Максимов, гематоксин Гейденгайна. Об. 10, ок. 20.

Рис. 4. Культура почек плодов белой крысы через два дня после посева. Гломерулярные клетки (внизу), тубулярные клетки (в середине) и рыхло расположенные фибробласты. Максимов, гематоксин Гейденгайна. Об. 10, ок. 20.



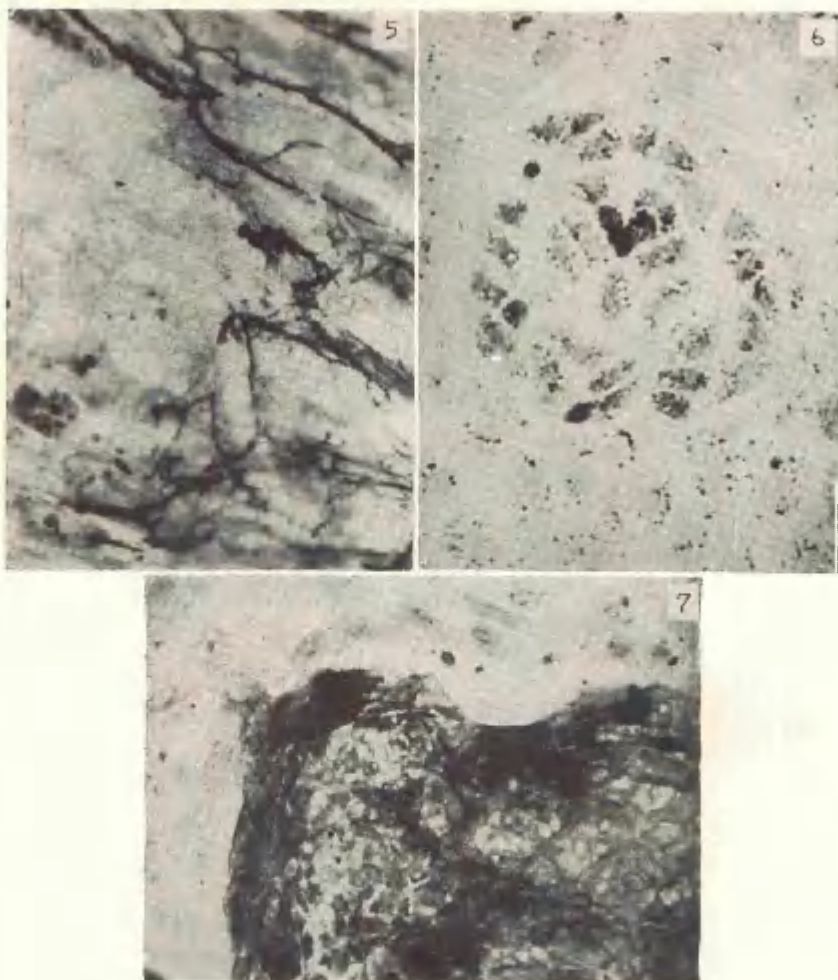


Рис. 5. Культура почек кролика через 12 дней после посева. Аргирофильные волокна на фибробластах. Тубулярные клетки слева. Максимов, гематоксилин Гейденгайна. Об. 10, ок. 90.

Рис. 6. Культура почки овечьего плода через два дня после посева. Активность кислой фосфатазы в гломерулярных (в середине) и в окружающих тубулярных клетках. Бэкер, метод Гомори в модификации Гольт. Ок. 10, об. 20.

Рис. 7. Культура почки овечьего плода через четыре дня после посева. Активность щелочной фосфатазы в гломерулярных (справа) и тубулярных (слева) клетках. Бэкер, метод Гомори. Об. 20, ок. 20.

THE CELL TYPES IN PRIMARY TRYPSINIZED KIDNEY CULTURE

S. Veroman

Summary

A study of primary monolayer trypsinized kidney cultures of man, rabbit, cat, dog, sheep, rat and chicken was carried out. Three main types of cells can be distinguished: The tubular cells are characterized by formation of epithelioid membranes. The fibroblasts are presented by star-shape cells connected with one another by processes and forming argyrophile fibers. The glomerular cells grow in form of nids consisting of smaller spindle-shape or polygonal cells. The species-specific as well as the cytochemical peculiarities of these cells are reported.

ПРОБЛЕМА БИОЛОГИЧЕСКОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ГЛИО-ЭПЕНДИМАЛЬНОЙ ТКАНИ

К. И. Пыльдвере

Центральная медицинская научно-исследовательская лаборатория Тартуского государственного университета

Одним из условных вопросов, связывающих гистологию и невропатологию, является биологическая специфичность глио-эпендимальной ткани.

Общеизвестно многообразие форм глио-эпендимальной ткани — от плоского эпителия в виде арахноидэндотелия до причудливых силуэтов астроцитов в препаратах, импрегнированных по Гольджи. Является ли все это клеточное многообразие элементов глио-эпендимальной ткани центральной нервной системы лишь выражением морфо-физиологической пластичности к разным условиям микросреды в пределах органа? Или отдельные формы глио-эпендимальной ткани центральной нервной системы имеют свою биологическую специфичность в виде определенных, генетически или эпигенетически фиксированных реактивных свойств при разных условиях и в виде разных потенций к определенным превращениям?

Такой вопрос далеко не праздный. Дело в том, что Н. Г. Хлопин в своей книге (1946) об общебиологических основах гистологии отрицает фиксированную биологическую специфичность астроцитов, олигодендроглиоцитов, эпендимальных клеток и микроглии и считает, что различия между ними можно сравнить с различиями между базальными клетками эпидермального эпителия, расположенными на два-три слоя выше. А патологическая гистология придерживается как раз противоположного мнения. Может быть, именно это обстоятельство является одной из причин, почему идеи Н. П. Хлопина не получили достаточного развития в невропатологии.

Настоящий доклад представляет собой краткий обзор, в котором на основе литературных данных и собственных исследований рассматривается вопрос о биологической специфичности глио-эпендимальной ткани центральной нервной системы, с уче-

том следующих аспектов вопроса: нормальная морфология, включая ультраструктуру, фило- и онтогенетическое развитие, реакции и превращения в патологических условиях и, наконец, тканевые культуры, на которые здесь делается основной упор.

Морфологические различия между отдельными клеточными формами глии хорошо описаны уже Кахалем и его сотрудниками (Кахаль — Cajal, 1913, 1920; Ачукарро — Achúcarro 1913; дель Рио-Ортега — del Rio-Hortega, 1920, 1921^{a, б}, 1928), Пенфильдом (Penfield, 1924, 1932) и другими исследователями. Некоторые адаптивные формы астроглии к отдельным участкам центральной нервной системы — маргинальная глия Гельда (Held, 1909^a), глия Аммониева рога (Ачукарро, 1914), мозжечка (Фаньянас — Fañanas, 1915), обонятельной луковицы (де Кастро — de Castro, 1920) — не выходят из общих рамок характеристики астроглии. Современные исследователи придерживаются классических описаний (П. Е. Снесарев, 1950; Глис — Glees, 1955; Уйндл — Windle, 1959 и др.). Ясные морфологические различия между отдельными элементами глии не в меньшей мере выявляются при помощи электронного микроскопа (Люз — Luse, 1956^a, Фаркар и Гартман — Farquar a. Hartman, 1957; Шульц, Майнард и Низ — Schultz, Maynard a. Pease, 1957; Флайшгауер — Fleischhauer, 1958; де Робертис и Гершенфельд — de Robertis a. Herschenfeld, 1961; Вольф — Wolff, 1963). С морфологическими данными хорошо согласуются современные представления о разных функциях разных клеточных элементов глии (Глиз, 1955; Лумсден — Lumsden, 1955, 1957; Люз, 1956^б; Уйндл, 1959; Вольф, 1963). По этим данным астроглия является поддерживающим элементом и обеспечивает активный транспорт промежуточных продуктов трофического обмена между кровеносными сосудами и нейронами, олигодендроглия образует миелиновую оболочку и играет главную роль в обмене воды и электролитов в мозговой ткани, а микроглия участвует в расщеплении и элиминации нерастворимых продуктов обмена.

Морфология эпендимальных клеток (Рецциус — Retzius, 1893; Агдур — Agduhr, 1932), эпителиальных клеток сосудистого сплетения мозга (Агдур, 1932) и арахноидэндотелия (Кей и Рецциус — Key u. Retzius, 1876; Уйд — Weed, 1932) не оставляет сомнения в резко выявленной специфичности указанных элементов.

Сравнительно-гистологические данные относительно филогенетического развития глио-эпендимальной ткани (Ачукарро, 1915; Серра — Serra, 1922; Капперс — Kappers, 1934; Байрати — Bairati 1948^{a, б}, 1949, 1950, 1953; Конту — Contu, 1952; Байрати и Макконьяни — Bairati e Maccognani, 1949; Байрати и Триполи — Bairati e Tripoli, 1953; Горстман — Horstmann, 1954) до сих пор неполные.

Исходной формой для филогенетического развития нейроглии у позвоночных является эпендимальная глия, которая, будучи исключительной формой глии у бесчерепных и у низших рыб, сохраняется у всех позвоночных. Дальнейшая эволюция нейроглии связана с появлением и развитием внутримозговых кровеносных сосудов и миелинизацией нервных волокон, что впервые отмечается у поперечнополосатых. У амфибий, а зачастую уже у костистых рыб имеются наряду с эпендимальными клетками уже внутримозговые глиальные клетки (*celulas epiteliales dislocadas* по Кахалю, *cellules autonomes névrogliales* по Ачукарро). Настоящие мультиполярные астроциты имеются как у млекопитающих, так и у птиц.

Наряду с усовершенствованием внутримозговой глии отмечается усовершенствование контакта между глиальными клетками и кровеносными сосудами и поляризация глии в направлении кровеносный сосуд — нейрон (Ачукарро, 1915). То же происходит при онтогенетическом развитии (де Кастро, 1920).

Олигодендроглия впервые встречается у рептилий (Ачукарро, 1915). В связи с этим остаются открытыми отношения между глией и миелинизацией у рыб и амфибий, у которых нет олигодендроглии. Небезынтересно здесь указать на интригующее сообщение Хильда (Hild, 1957⁶), что отростки нервных клеток в тканевых культурах миелинизируются без участия глии.

Из изложенного вытекает, что биологическая специфичность отдельных форм нейроглии у высших позвоночных является продуктом сложной тканевой эволюции. Фактором дивергентной эволюции исходного тканевого элемента — эпендимальной глии — является усовершенствование нейронной системы и обмена веществ мозга. Общность тех же факторов для разных систематических групп одновременно является фактором параллельной эволюции нейроглии, что особенно заметно при сравнении млекопитающих и птиц (а также позвоночных и беспозвоночных). На наш взгляд, нейроглия служит хорошим материалом для развития идей А. А. Брауна и В. П. Михайлова (1958) о возможности синтеза теорий тканевой эволюции А. А. Заварзина и Н. Г. Хлопина.

Что касается микроглии, то она достаточно известна только у млекопитающих. Имеющиеся данные о микроглии у амфибий (Серра, 1922, К. И. Пыльдвер и Р. Н. Микельсаар, 1963) нуждаются в дальнейшей разработке.

Судя по разным описаниям, эпителий сосудистого сплетения мозга и арахноидэндотелий не подвергались существенных изменений в филогенезе.

Исследования по онтогенетическому развитию нейроглии и эпителия сосудистых сплетений (Гис — His, 1889, 1901, 1904; Гельд — Held, 1909⁶; Кахаль, 1909, 1913; де Кастро, 1920; Бейли и Кушинг — Bailey and Cushing, 1926; Пенфильд, 1932) показы-

вают раннее приобретение биологической специфичности отдельными клеточными формами нейроглии. Следует считать доказанным мезенгимальную природу микроглии (дель Рио-Ортега, 1921, 1932). Мнение В. К. Белецкого (1932) о мезенгимальной природе олигодендроглии противоречит всем сведениям о глии. Спор о мезенгимальном или нейроэктодермальном происхождении микроглии и арахноидэндотелия в значительной мере разрешается современными данными об эктомезенгеме.

Из множества патологических реакций нейроглии мы упомянем здесь лишь те, которые особенно наглядно демонстрируют биологическую специфичность отдельных клеточных элементов глиоэпендимальной ткани (рис. 1). Прежде всего обращает на себя внимание различная чувствительность этих форм по отношению к повреждающим агентам. По сравнению с астроцитами из нейроглии особенно ранимыми являются олигодендроглиocyты (Криспин-Экснер — Krysipin-Eksner, 1943; К. И. Пыльдвере, 1964), что может привести к ложному выводу при гибели последних о мономорфности реакции разных видов глии.

Гипертрофированные астроциты (Ниссл — Nissl, 1899; дель Рио-Ортега, 1916, 1921; Шольц — Scholz, 1933; Люз, 1958) еще более резко, чем нормальные астроциты, отличаются от других видов глии. При этом особенно усиливается их полярность по отношению к кровеносным сосудам (К. И. Пыльдвере, 1964). Участие олигодендроглии в водно-солевом обмене особенно ярко выявляется при отеке мозга (П. Е. Снесарев, 1950; Пенфильд и Коун — Penfield a. Cone, 1926^{a, b}; Клацо, Пиро и Ласковский — Klatzo, Piraux a. Laskowski, 1958; Торэк, Терри и Циммерманн — Torack, Terry a. Zimmermann, 1959; Люз и Гэррис — Luse a. Harris, 1960; Розомоф и Цугиге — Rosomoff a. Zugibe, 1963). Микроглия может превращаться в палочковидные клетки или в макрофаги (дель Рио-Ортега, 1921). Из реакций арахноидэндотелия здесь заслуживают внимания способность образовывать макрофаги и своеобразные разрастания, структура которых напоминает паккионовы грануляции (Уйд, 1932).

Биологическая специфичность эпендимо-глиальной ткани сохраняется также при опухолевом росте, где в основу классификации опухолей взят именно гистогенетический принцип (Бейли и Кушинг, 1928).

Остаются тканевые культуры, которые в нашей проблеме являются *experimentum crucis*. Если допустить, что различные клеточные элементы глио-эпендимальной ткани действительно являются лишь выражением морфо-физиологической пластичности, то в единых условиях культивации следует ожидать исчезновения этих различий.

Нужно согласиться с Н. Г. Хлопиным, что те исследователи, которые культивировали нейроглию до него, не использовали

свой материал для анализа тканевых свойств нейроглии. Сам Н. Г. Хлопин в своих работах по нейроглии (1938, 1939, 1940, 1941, 1946, 1947, 1955) исследовал кусочковые эксплантаты разных участков центральной нервной системы поздних эмбрионов и новорожденных. Он пришел к выводу, что все элементы эпендимо-глиальной ткани растут в культуре по единому типу, а имеющиеся различия носят скорее топографический характер. В частности, он не мог убедиться в разностях роста и превращений отдельных видов глии. Однако в ряде работ после Второй мировой войны (напр. Хог — Hogue, 1947, 1953; Лумсден и Помра — Lumsden a. Pomerat, 1951; Костеро и Помра — Kostero a. Pomerat, 1952^{a, б}; Помра, 1951, 1952; Помра и Костеро, 1956; Хильд, 1957^{a, б}; Хильд и Тасаки — Hild a. Tasaki, 1962; Вольфграмм и Роуз — Wolfgram a. Rose, 1957; Окамото — Okamoto, 1958; Накай, 1962; Наказава, Томинага и Ямауши — Nakazawa, Tominaga a. Yamauchi, 1962; Гайгер — Geiger, 1963) показано сохранение в культуре астроцитов, олигодендроглиоцитами, микроглиоцитами и эпендимальными клетками своих морфологических и цитофизиологических особенностей. То же относится к покровным клеткам сосудистых сплетений и мягких мозговых оболочек, о которых речь будет ниже.

Приступим теперь к рассмотрению собственного материала.

Мы располагаем результатами культивирования целого головного мозга поздних эмбрионов курицы, овцы, крысы и морской свинки (15 серий), перивентрикулярной ткани человеческих плодов (10 серий), прогрессивно измененной нейроглии взрослого человека (4 серии), мультиморфной глиобластомы человека (9 серий), мягких мозговых оболочек человеческих плодов (5 серий) и менингеом (арахноидэндотелиом) (4 серии). Кусочки ткани диссоциировали при комнатной температуре при помощи трипсина и панкреатина, в качестве питательной среды служила среда Пака (Puck, 1956), для фибробластоподобных клеток с применением плацентарной сыворотки. Клетки, растущие на покровном стекле или снятые со стенок флакона при помощи целлоидиновой пленки, фиксировали смесями Максимова, Россмана или Карнуа и окрашивали тионином, гематоксилинами Вейгерта и Гейденгайна, суданом черным и реакцией МакМанус-Гочкисс.

Нужно отметить, что часто диссоциирование клеток центральной нервной системы не удается с такой полнотой, как это происходит при трипсинизации многих других тканей, и вместе с изолированными клетками в культуру попадают мелкие кусочки, которые хорошо прикрепляются на стекле и дают хорошие зоны роста вокруг них. Во многих случаях это очень выгодно, так как по центральным кусочкам часто удается определить исходную ткань для роста (напр. мягкие мозговые оболочки, эпендима, сосудистое сплетение).

В отличие от Н. Г. Хлопина нам удалось в культурах центральной нервной системы различить все клеточные элементы глио-эпендимальной ткани.

Астроциты в культуре сразу бросаются в глаза своими более крупными размерами и звездчатой формой (рис. 2, 3, 13). Ядро круглое или овальное, с несколькими ядрышками. Нередко отмечается разделение цитоплазмы на эндо- и экзоплазму. У каждой клетки в среднем 3—6 длинных (до нескольких сотен микронов) отростков, которые иногда разветвляются. Основания отростков широкие и конические. По ходу отростков образуются варикозные или плоские, эксцентрические по отношению к отросткам многоугольные расширения. Подобные же расширения в виде ундулирующих мембран нередко имеются на концах отростков, как свободных, так и контактирующих между собой.

В культурах реактивно измененных астроцитов человека отмечается полиморфизм клеток по величине их, по количеству и размерам ядер в клетках, а также по отросткам. Чаше наблюдаются многоядерные гигантские астроциты, которые напоминают откормленные астроциты в исходном материале.

Еще более выраженный полиморфизм астроцитов наблюдается в культурах мультиформной глиобластомы (рис. 4). Кроме того, наряду с астроцитами здесь растут более мелкие продолговатые спонгиобластоподобные клетки с длинными полярными отростками.

Олигодендроглия в культурах представлена в виде мелких круглых или коротких веретенообразных клеток с несколькими тонкими, относительно короткими отростками (рис. 5). Последние более равномерны, чем у астроцитов, и отходят от клеточного тела без начального конусообразного отрезка. Плотное и круглое или слегка овальное ядро содержит несколько ядрышек, между которыми находятся крупные глыбки хроматина. Протоплазма олигодендроглиоцитов в культурах отличается сильным светопреломлением, сродством с основными красителями, а также сильно окрашивается гематоксилином Гейденгайна.

Эпендимальные клетки имеют в культуре следующие особенности. В зонах роста вокруг посеянных кусочков у эпендимальных клеток более эпителиоидный вид, чем у астроцитов (рис. 6). Они имеют форму неправильного треугольника, ближе к основанию которого размещается овальное светлое ядро с объемистой центроплазмой в юкстануклеарной области. Вершина треугольника образуется коротким толстым конусообразным отростком, радиально вытягивающимся в зонах роста. Такое же строение имеют эпендимальные клетки при росте после более сильного трипсинизирования, при исходном росте изолированных клеток (рис. 5, 7). В этих условиях отросток был длиннее, превышал своей длиной поперечник клеточного тела до 6 раз.

Отросток в конце расширяется в треугольную неправильную мембрану, размеры которой доходят до размеров клеточного тела. Кроме этого главного отростка из клеточного тела выходят еще несколько более мелких и коротких отростков. Эти клетки довольно сходны с астробласто-подобными клетками созревающей глии в культуре.

Рост и превращения трипсинизированных культур покровных клеток сосудистого сплетения являются предметом отдельного исследования М.-А. Кооль из нашей лаборатории, материалы которого помещены в настоящем сборнике (М.-А. Кооль, 1965). Мы ограничимся здесь указанием, что эти клетки в культурах растут в виде эпителиоидной мембраны из большей части полигональных клеток (рис. 8). В старых культурах они нередко снабжены короткими тупыми отростками, контактирующими друг с другом.

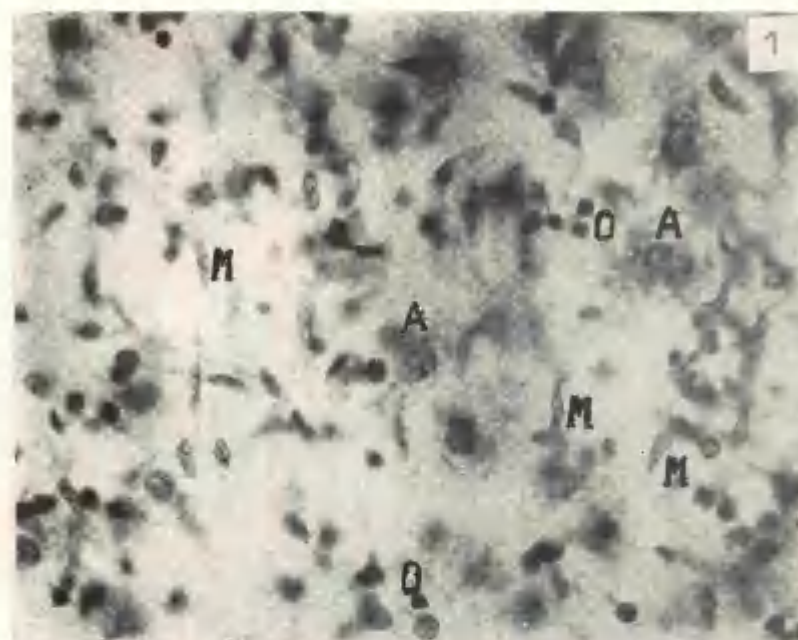
В наших культурах не было отмечено клеток, которые можно было бы сравнивать с клетками нормальной микроглии. Однако, особенно в культурах постнатального головного мозга, закономерно встречались макрофаги, погруженные липоидами (рис. 9). Они отличались от дегенерирующих и содержащих жиры глиальных клеток своими более мелкими размерами и псевдоподиеобразными выростами клеточного тела и напоминали своей морфологией активированные микроглиоциты при патологических процессах.

Мягкие мозговые оболочки растут в культуре двояким образом (рис. 10, 11, 12). Во-первых, в виде эпителиоидных разрастаний из полигональных клеток, имеющих на краях зон рост несколько коротких тупых отростков. Такие же отростки наблюдаются при разрыхлении клеточных мембран. Во-вторых, в виде веретенообразных или сильно вытянутых в длину отростчатых фибробластоподобных клеток. То же самое было отмечено в культурах арахноидэндотелиом (менингеом). От настоящих фибробластов фибробластоподобные клетки культур мягких мозговых оболочек отличаются расположением под более тупым углом по отношению друг к другу и тенденцией образовать клеточные скопления, в которых иногда наблюдается возникновение концентрических структур, напоминающих подобные образования (псаммоматозные тельца) в мягких мозговых оболочках в норме и при опухолевом росте.

Интересные результаты были получены культивированием перивентрикулярной ткани плодов человека и лабораторных

Рис. 1. Глиальные клетки вблизи коркового размягчения. Гипертрофия астроцитов (А) и микроглиоцитов (М), острое набухание олигодендроглиоцитов (О). Видны гиперхроматические или пикнотические ядра последних.
Тионин, ок. 20, об. 20.

Рис. 2. Астроциты куриного эмбриона в культуре. Гематоксилин Гейденгайна, ок. 10, об. 20.



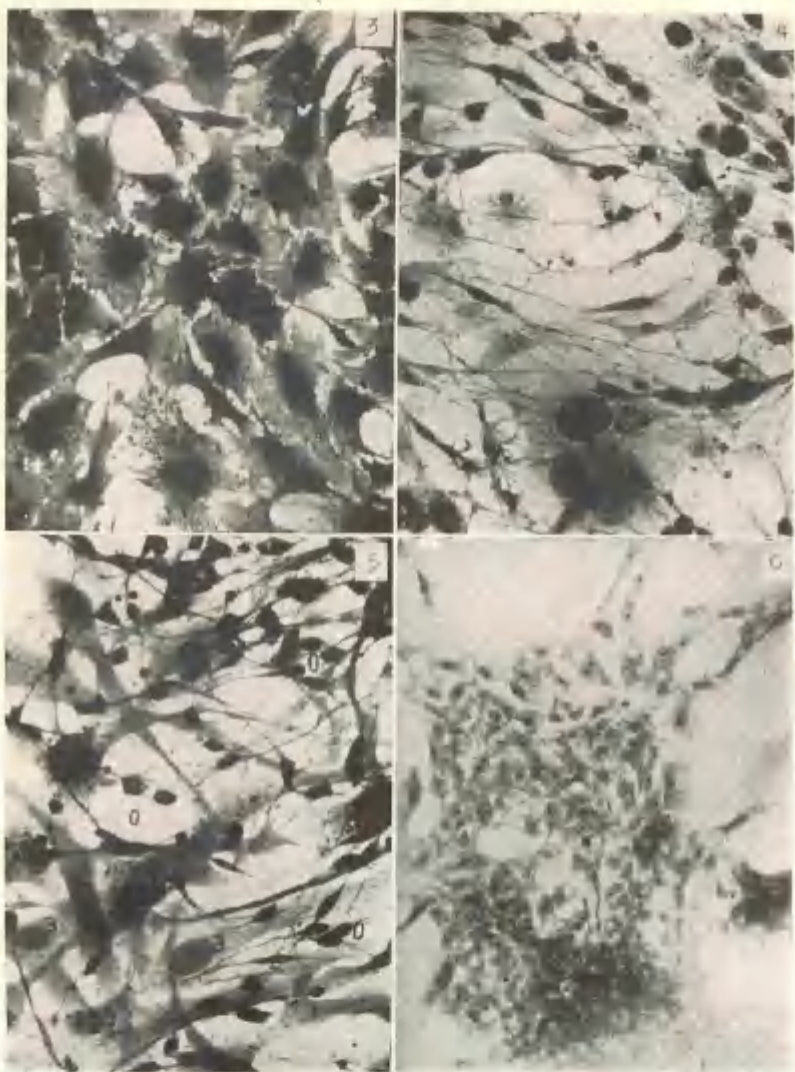


Рис. 3. Астроциты эмбриона овцы в культуре. Гематоксилин Гейденгайна, ок. 15, об. 20.

Рис. 4. Клетки мультиформной глиобластомы в тканевой культуре. Гематоксилин Гейденгайна, гомаль VI, об. 20.

Рис. 5. Олигодендроглиоциты (o) и эпендимоподобные клетки в культуре перивентрикулярной ткани головного мозга эмбриона человека. Гематоксилин Гейденгайна, ок. 20, об. 20.

Рис. 6. Зона роста вокруг кусочка эпендимы в тканевой культуре. Тионин, ок. 12,5, об. 9.

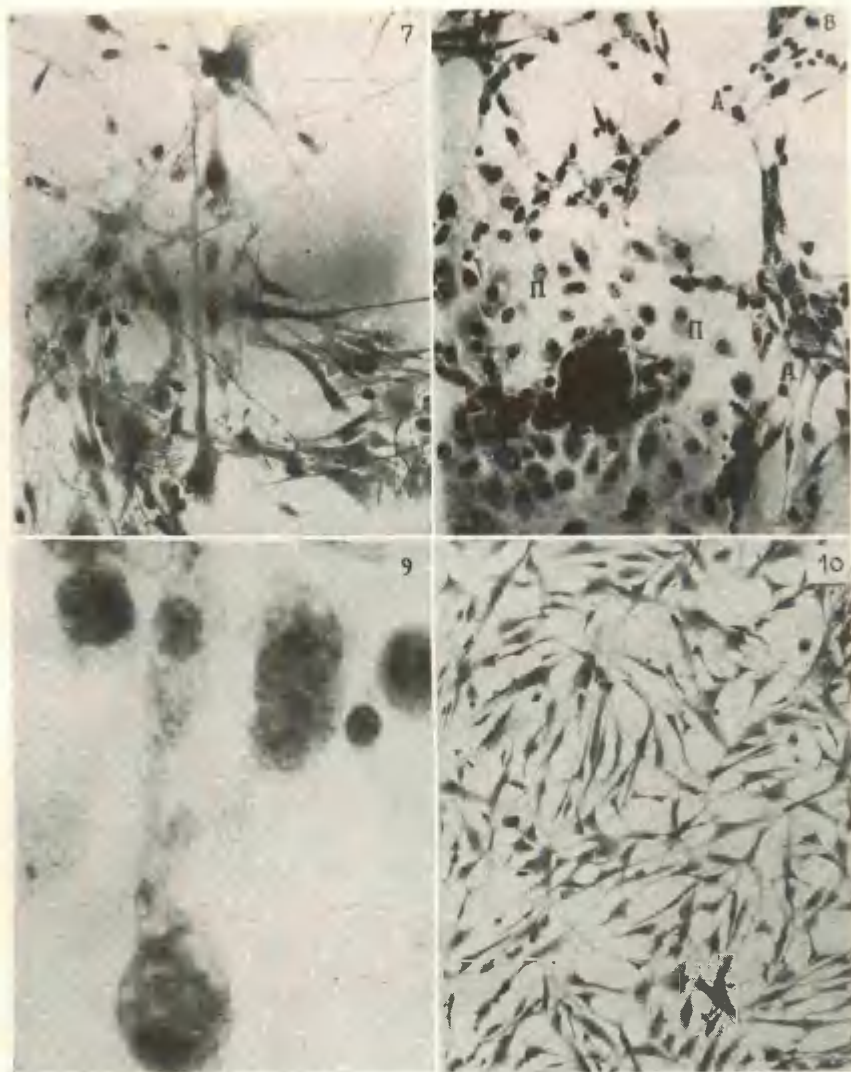


Рис. 7. Эпендимальные клетки из культуры перивентрикулярной ткани головного мозга эмбриона человека. Гематоксилин Гейденгайна, ок. 10, об. 10.

Рис. 8. Зона роста покровных клеток (п) сосудистого сплетения мозга в тканевой культуре головного мозга эмбриона крысы. а — астроциты. Тионин, ок. 12,5, об. 9.

Рис. 9. Превращение микроглиоцитов в макрофаги в культуре коры большого мозга взрослого человека. Гематоксилин Гейденгайна, ок. 10, об. 60.

Рис. 10. Фибробластоподобные клетки в культуре мягких мозговых оболочек человеческого эмбриона. Гематоксилин Гейденгайна, ок. 12,5, об. 9.

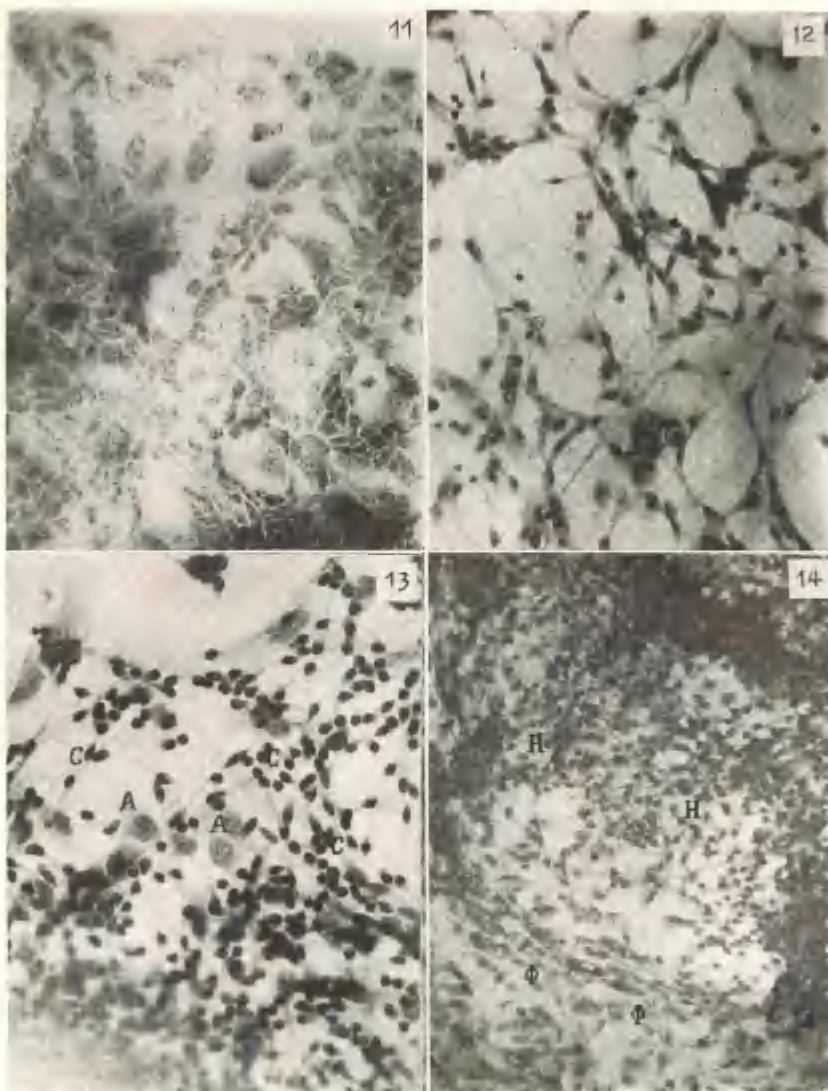


Рис. 11. Эпителиоидные клетки в культуре менингеомы человека. Гематоксилин Гейденгайна, ок. 12,5, об. 9.

Рис. 12. Фибробластоподобный рост менингеомы человека в культуре. Стрелка указывает на образование характерной для псамматозной менингеомы концентрической структуры. Гематоксилин Вейгерта, ок. 12,5, об. 9.

Рис. 13. Миграторные спонгиобласты (С) и астроциты (А) в культуре перивентрикулярной ткани большого мозга эмбриона человека. Гематоксилин Гейденгайна, ок. 10, об. 20.

Рис. 14. Совместный рост нейроглий (Н) и фибробластов (Ф) трипсинизированной тканевой культуры эмбриона курицы. Тиниин, ок. 12,5, об. 9.

животных (рис. 13). Кроме астроцитов и эпендимальных клеток в культурах отмечаются веретенообразные биполярные клетки, размеры которых гораздо меньше по сравнению с другими клетками. Ядро их сильно окрашивается. Оно находится ближе к одному из полюсов клетки, оставаясь в стороне противоположного полюса больше, чем цитоплазма. Против этой части плазмы ядро вогнутое. От полюсов клеточного тела отходят два тоненьких отростка, основание которых в том полюсе, где находится ядро, более узкое, чем в противоположном полюсе. В стороне ядра отросток может совсем отсутствовать. Удаётся наблюдать все переходы до зрелых олигодендроглиоцитов или через астробластоподобные клетки в астроциты.

По нашему мнению, описываемые клетки являются спонгиобластами.

В трипсинизированных культурах, при наличии клеток разных типов, обращает на себя внимание то, что клетки сосудистых сплетений и арахноидэндотелия растут изолированными, чётко отграниченными колониями, не смешиваясь с другими клетками (рис. 8). Наоборот, астроциты, олигодендроглиоциты, микроглиоциты и эпендимальные клетки растут в составе единой клеточной мембраны, не обособляясь друг от друга. При совместном росте нейроглиальных клеток и фибробластов отмечается то же самое (рис. 14).

Итак, на основе собственных данных мы пришли к выводу, что отдельные клеточные элементы при культивировании вне организма сохраняют свою биологическую специфичность и детерминированность. Примером строгой биологической специфичности является также наличие видовых различий в культурах. Это хорошо согласуется с данными Кахалы (1913) о морфологических различиях глиальных клеток лиссэнцефальных и гирэнцефальных животных.

По своей биологической специфичности наиболее близкими друг к другу являются астроциты, олигодендроглиоциты и эпендимальные клетки, которые в организме образуют единое функциональное целое в качестве интерстициальной ткани центральной нервной системы, являясь в то же время достаточно специализированными и детерминированными. Требуется дальнейшее исследование стойкости детерминации этих отдельных клеточных элементов. Это касается особенно олигодендроглии. Дело в том, что миграторные или полярные спонгиобласты, которые Пенфильд (1928, 1932) описывал в качестве предшественников олигодендроглии, в то же время по его данным могут превращаться в астроциты. Дальше, некоторые невропатологи, например Л. И. Смирнов (1941), допускают превращение олигодендроглиоцитов в астроциты при пролиферативных процессах неврологии. Такое же превращение, по некоторым данным, свой-

ственно и олигодендроглиомам как *in vivo* (Равенс, Адамкевич и Грофф — Ravens, Adamkiewicz a. Groff, 1955), так и *in vitro* (Л. П. Липчина, 1952).

Более обособленными от других клеточных типов эпендимоглиальной ткани являются клетки сосудистых сплетений мозга и клетки арахноидэндотелия. В тканевых культурах первые всегда и вторые часто сохраняют свою эпителиоподобную морфологию.

Особо следует остановиться на особенностях арахноидэндотелия в тканевых культурах. Что они дают для выяснения тканевой принадлежности арахноидэндотелиом?

Часть исследователей, начиная с Кэлликера (Kölliker, 1880), придерживается мнения о мезодермальном или мезенхимальном генезе покровных клеток мягких мозговых оболочек. Другие же высказываются в пользу нейроэктодермального происхождения арахноидэндотелия (Оберлэн — Oberling, 1922).

Наши результаты не отличаются от результатов культивирования мягких мозговых оболочек Н. Н. Каннегиссера (1938, 1940), а также Блэнд (1939), Костеро, Помра, Даррото-Могель и Кэксес (Costero, Pomerat, Darroto-Mogel a. Chexes, 1955) и Керстинг и Леннарц (Kersting a. Lennartz, 1958) по менингеомам. Вместе с Н. Г. Хлопиным мы считаем, что рост в виде комплексных эпителиоподобных мембран и характерных лучевых и вихревых структур четко отличает рост арахноидэндотелия от роста фибробластов. Кроме того, в отличие от фибробластов, для клеток эпендимо-глиальной ткани в культуре является характерным расположение между собой под более тупым углом, чем это свойственно фибробластам. Конвергентное сходство с фибробластами неудивительно, если считать мягкие мозговые оболочки производными эктомезенхимы. Кроме того, не исключено, что более эпителиоподобный рост дают одни и более фибробластоподобный рост другие клетки в составе исходной ткани для культивации. Так, И. А. Алов (1947) обнаружил, что клетки арахноидэндотелия на внешней поверхности паутинной оболочки полигональные и эпителиоидные, а на внутренней поверхности отростчатые и более фибробластоподобные. Гонатас и Безен (Gonatas a. Besen, 1963) нашли при электронмикроскопическом исследовании в менингеомах также два типа клеток — эндотелиоподобные и фибробластические.

Сохранение биологической специфичности в единых условиях культивации разных клеточных элементов глио-эпендимальной ткани свидетельствует, что эта специфичность не является результатом морфо-физиологической пластичности или модуляций, а обуславливается различной детерминацией этих типов в рамках развития глио-эпендимальной ткани.

То же вытекает, как мы видели, при изучении нормальной морфологии, фило- и онтогенетического развития, патологиче-

ских реакций глио-эпендимальной ткани. Это не противоречит общим идеям Н. Г. Хлопина об эволюции тканей, а наоборот, является дальнейшим подтверждением их правильности и плодотворности.

ЛИТЕРАТУРА

Алов И. А. О циркуляции жидкости в субдуральном пространстве головного мозга и о барьерной функции его паутинной оболочки. Дисс. М., 1947. — Белецкий В. К. О гистогенезе микроглии. Сов. психоневрология 8, 1—2, 60, 1932. — Каннегиссер Н. Н. Рост и превращение *in vitro* элементов мягких мозговых оболочек. ДАН СССР 18, 2, 123, 1938. — Каннегиссер Н. Н. Рост и превращение элементов мягких мозговых оболочек головного мозга вне организма. Арх. анат., гист. и эмбр., 23, 1—2, 135, 1940. — Пыльдвере К. И. О цитологических и гистохимических изменениях при прогрессивных реакциях невроглии. Научные труды высших учебных заведений Литовской ССР, Медицина, V, 19, 1964. — Смирнов Л. И. Гистопатология нервной системы. Руководство по неврологии, т. 2, в. 1, М.—Л., 1941. — Снесарев П. Е. Теоретические основы патологической анатомии психических болезней I. М., 1950. — Снесарев П. Е. Невроглия. В кн. Многотомное руководство по неврологии. 1, I. 219, М., 1955. — Хлопин Н. Г. Опыт экспериментального анализа вспомогательных компонентов нервной системы. ДАН СССР 18, 16, 1938. — Хлопин Н. Г. Рост и превращение вне организма тканевых элементов зрительных путей. Арх. анат., гист. и эмбр., 21, 54, 1939. — Хлопин Н. Г. О культивировании вне организма нейрогенных опухолей человека. ДАН СССР 41, 32, 1943. — Хлопин Н. Г. Рост и превращения глиоэпендимных элементов спинного мозга вне организма. ДАН СССР 41, 59, 1943. — Хлопин Н. Г. Культура тканей. Медгиз, Л., 1904. — Хлопин Н. Г. Опыты с эксплантацией нейроглии белого вещества полушарий головного мозга. ДАН СССР 31, 7, 703, 1941. — Хлопин Н. Г. Общебиологические экспериментальные основы гистологии. Изд. АН СССР, 1946. — Хлопин Н. Г. Экспериментально-гистологические исследования нейроглии. Часть первая. Журн. общей биологии, 7, 311, 1947. — Хлопин Н. Г. Экспериментально-гистологические исследования нейроглии. Часть вторая. Журн. общей биологии, 8, 473, 1947. — Хлопин Н. Г. Рост и изменения вне организма эмбриональной нейроглии зрительных пучков человека. Бюлл. эксп. биол. и мед., 40, 10, 53, 1955. —

Achúcarro N. Contribución al estudio gliotectónico de la corteza cerebral. Trab. del Lab. Inv. Biol., 12, 229, 1914. — Achúcarro N. De l'évolution de la névroglie, et spécialement de ses relations avec l'appareil vasculaire. Trab. del Lab. Inv. Biol., 13, 169, 1915. — Agduhr E. Choroid plexus and ependyma. In *Cytology & Cellular Pathology of the Nervous System*. Ed. by W. Penfield, Hoeber 4, 537, 1931. — Ariëns Kappers C. U. Feinerer Bau u. Bahnverbindungen des Zentralnervensystems. Hbd. vgl. Anat. d. Wirbelt., 2, I. 319, 1934. — Bailey P. a. H. Cushing. A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. Lippincott, Philadelphia. London a. Montreal, 1926. — Bairati A. Osservazioni comparate sulla glioarchitettonica. Boll. Accad. Sci. Ist. Bologna. Ser. X, 6, 55, 1948. — Bairati A. Appunti sulla glioarchitettonica del nevrasso dell'uomo. Monit. Zool. ital. Suppl. 52, 105, 1948. — Bairati A. Ulteriori ricerche sui caratteri della birefringenza delle fibre di nevroglia. Boll. Soc. ital. Biol. Sper. 25, 927, 1949. — Bairati A. e F. Maccagnani. Ricerche sulla

glioarchitettonica dei vertebrati II^o Uccelli. Monit. Zool. ital. Suppl. 58, 53, 1949. — Bairati A. Morfologia e struttura dei gliociti. Biol. Lat. (Milano) 2, 601, 1950. — Bairati A. Ricerche comparative sui mucopolisaccardi del sistema nervoso centrale dei vertebrati. Alt. Accad. Pugliese Scienze-Bari 10, 603, 1953. — Bairati A. Ricerche morfologiche ed istochimiche sulla glia del neurasse di vertebrate I^o Anfibi. Z. Zellf. 39, 392, 1953. — Bairati A. e Q. Bartoli. Ricerche morfologiche ed istochimiche sulla glia del neurasse di vertebrati. II^o Uccelli. Z. Zellf. 42, 273, 1955. — Bland J. O. W. The growth of human meningioma in culture compared with that of certain human tissues. Arch. f. exp. Zellf., 22, 369, 1939. — Cajal S. Ramon y. Histologie du système nerveux de l'homme et des vertébrés. I. Paris A. Maloine, 1909. — Cajal S. Ramon y. Contribución al conocimiento de la neuroglia del cerebro humano. Trab. del Lab. de Invest. biol., XI, 255, 1913. — Cajal S. Ramon y. Algunas consideraciones sobre la mesoglia de Robertson y Rio-Hortega. Trab. del Lab. de Invest. biol., 18, 109, 1920. — Castro F. de. Estudios sobre la neuroglia de la corteza cerebral del hombre y de los animals. I La arquitectonica neurógica y vascular del bulbo olfativo. Trab. del Lab. de Inv. biol., 18, 1, 1920. — Castro F. de. Algunas observaciones sobre la histogénesis de la neuroglia en el bulbo olfativo. Trab. del Lab. de Inv. biol., 18, 83, 1920. — Contu P. Ricerche sulla glioarchitettonica dei rettili. Arch. ital. Anat. Embriol., 58, 295, 1953. — Costero J. y C. M. Pomerat. Propriedades del tejido nervioso conservado fuera del organismo. Ciencia (Mex.), 12, 9, 1952. — Costero J., C. M. Pomerat, R. A. Daersto-Mogud, A. Z. Chexes. Tumors of the human nervous system in tissue culture. I The cultivation and cytology of meningioma cells. J. Nat. Cancer Inst., 15, 1319, 1955. — Fananás J. Ramón y. Contribución al estudio de la neuroglia del cerebelo. Trab. del Lab. de Inv. biol., 14, 163, 1915. — Farquar M. G. a. J. E. Hartman. Neuroglial structure and relationship as revealed by electron microscope. J. Neuropath. Exp. Neurol., 16, 18, 1957. — Fleischhauer K. Über die Feinstruktur der Faserglia. Z. Zellf., 47, 458, 1958. — Geiger Ruth S. The behaviour of adult mammalian brain cells in culture. Int. Rev. of Neurobiology, 5, 1, 1963. — Glees P. Neuroglia. Morphology a. Function. Publication 269, Am. Lecture Series, Springfield, Ill. Charles C. Thomas, 1955. — Gonatas N. K. a. M. Besen. An electron microscopic study of three human psammomatous meningiomas. J. Neuropath. a. exp. Neurology, 22, 263, 1963. — Held H. Über die Neuroglia marginalis der menschlichen Grosshirnrinde. Monatschr. Psychiatrie 26, 360, 1909. — Held H. Entwicklung des Nervengewebes bei den Wirbeltieren. Barth, Leipzig, 1909. — Hild W. Ependymal cells in tissue culture. Zeitschr. für Zellf., 46, 259, 1957. — Hild W. Observations on neurons a. neuroglia fibers from the area of the mesencephalic V nucleus of the cat in vitro. Z. Zellf., 47, 127, 1957. — Hild W. a. J. Tasaki. Morphological a. physiological properties of neurons and glial cells in tissue cultures. J. Neurophysiol., 25, 2, 277, 1962. — His W. Die Neuroblasten und deren Entstehung im embryonalen Mark. Arch. Anat. Entwicklungsgesch., 249, 1889. — His W. Das Princip der organbildenden Keimbezirke und die Verwandtschaften der Gewebe. Arch. Anat. Entwicklungsgesch., 307, 1901. — His W. Die Entwicklung des menschlichen Gehirns. Leipzig, 1904. — Hogue M. J. Human fetal brain cells in tissue cultures, their identification a. motility. J. Exp. Zool., 106, 85, 1947. — Hogue M. J. A study of adult human brain cells grown in tissue cultures. Am. J. Anat., 93, 397, 1953. — Horstmann E. Die Faserglia des Selachiergehirns. Z. Zellf., 39, 588, 1954. — Key A. a. G. Retzius. Studien in der Anatomie des Nervensystems und des Bindegewebes. Stockholm, Norstedt u. Söhne, 1876. — Kersting G. a. H. Lennartz In vitro cultures on human meningioma tissue. J. Neuropath. a. Exp. Neurol., VXi, 507, 1958. — Klatzo J., A. Piraux a. E. J. Laskowski. The relationship between edema, blood-brain barrier and tissue elements in a local brain injury. J. Neuropath. Exp. Neurol., 17, 548, 1958. — Kölliker H. Grundriss der Entwicklungsgeschichte des Menschen. Leipzig, Engelmann 1880.

— Kryspin-Exner W. Beiträge zur Morphologie des Glia im Nissl-Bilde. *Z. Anat.*, 112, 389, 1943. — Lumsden C. E. a. C. M. Pomerat. Normal oligodendrogliaocytes in tissue culture. *Exp. Cell Res.*, 2, 103, 1951. — Lumsden C. E. The cytology and cell physiology of the neuroglia and the connective tissue in the brain with reference to the blood-brain barrier. *Proc. 2nd Internat. Congress on Neuropathology, Lond., Excerpta Med. Found Amsterdam*, 373, 1955. — Lumsden C. E. Function aspects of glial apparatus. *Acta neurol. et psych. belg.*, 5, 57, 472, 1957. — Luse S. A. Electron microscopic observation of the central nervous system. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 531, 1956. — Luse S. A. Formation of myelin in the central nervous system of mice and rats, as studied with the electron microscope. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 2, 777, 1956. — Luse S. A. Ultrastructure of reactive and neoplastic astrocytes. *Lab. Inv.*, 7, 401, 1958. — Luse S. H. a. B. Harris. Electron microscopy of the brain in experimental edema. *J. Neurosurgery*, XVII, 3, 439, 1960. — Nakai J. Transformation and multiplication of neuroglia in tissue culture. In: *Proc. IV International Congress of Neuropathology, Munich*, 4.—8. Sept. 1961, ed. H. Jakob, vol. II, Stuttgart, G. Thieme, 241, 1962. — Nakazawa T., J. Tominaga, K. Yamauchi. Morphological concepts of astrocytes, based on tissue culture. *Proc. IV Internat. Congress of Neuropathology Munich*. 4.—8. Sept. 1961, ed. H. Jakob, vol. II, 246, Stuttgart, G. Thieme, 1962. — Nissl F. Über einige Beziehungen zwischen Nervenzellerkrankungen u. gliösen Erscheinungen bei verschiedenen Psychosen. *Arch. Psychiat. Nervenkr.*, 32, 1899. — Oberling Ch. Les tumeurs des méninges. *Bull. de l'association française pour l'étude du cancer*, 11, 365, 1922. — Okamoto M. Observations on neurons a. neuroglia from the area of the reticular formation grown in tissue culture. *Z. Zellf.*, 47, 269, 1958. — Penfield W. Oligodendroglia and its relation to classical neuroglia. *Brain*, 47, 430, 1924. — Penfield W. a. W. Cone. The acute regressive changes of neuroglia (Ameboid glia and acute swelling of oligodendroglia). *J. Psychol. u. Neurol.*, 34, 204, 1926. Penfield W. Neuroglia and microglia. In *Cewdry, Special Cytology*, Hoeber N.-Y., 1932. — Penfield W. a. W. Cone. A specific type of neuroglia change: acute swelling of oligodendroglia. *Arch. Neurol. Psychiat.*, 16, 131, 1926. — Penfield W. Neuroglia: normal and pathological, In: *Cytology and cellular pathology of the nervous system II*, Hoeber. N.-Y. 1932. — Pomerat C. M. Pulsatile activity of cells from the human brain tissue culture. *J. Nerv. Ment. Dis.* 114, 430, 1951. — Pomerat C. M. Rhythmic pulsatile activity in cells from the central nervous system. *An. Rec.*, 112, 473, 1952. — Pomerat C. M. Dynamic neurogliology. *Texas Rev. Biol. & Med.*, IV, 885, 1952. — Pomerat C. M. a. J. Costero. Tissue cultures of cat cerebellum. *Am. J. Anat.*, 99, 211, 1956. — Ravens J. R., L. L. Adamkiewicz a. A. R. Groff. Cytology a cellular pathology of the oligodendrogliomas of the brain. *J. Neuropath. Exp. Neurol.*, 14, 142, 1955. — Retzius G. Studien über Ependym und Neuroglia. *Biol. Untersuchungen*. N. 5, 1893. — Río-Hortega P. del. Contribution à l'étude de l'histopathologie de la neuroglie. Ses variations dans le ramollissement cérébral. *Trab. del Lab. de Invest. biol.*, XIV, 1, 1916. — Río-Hortega P. del. La microglia y su transformación en células en bastoncito y cuerpos gránulo-adiposas. *Trab. del Lab. de Invest. biol.*, 18, 37, 1910. — Río-Hortega P. del. El tercer elemento de los centros nerviosos: Histogenesis y evolución normal: exodo y distribución regional de la microglia. *Mem. de la Real. Soc. Espan. de Hist. Natural*, 21, 213, 1921. — Río-Hortega P. del. Estudios sobre la neuroglia. La glia de escasas radiaciones (oligodendroglia). *Bol. Real. Soc. Esp. de Historia Natural*, 21, 63, 1921. — Río-Hortega P. del. Tercera aportación al conocimiento morfológico e interpretación funcional de la oligodendroglia. *Mem. Soc. Real. Esp. Historia Natural*, 14, 1, 1928. — Robertis E. de a. H. M. Gerchfeld. Submicroscopic morphology and function of glial cells. In *International Review of Neurobiology*, vol. 3, Nov. 1961, Acad. Press, N.Y. a. London — Rosomoff H. a. F. Zugibe. Distribution of intracranial contents in experimental edema. *Arch. Neurol.*, 9, 1, 1963. — Scholz W.

Einiges über progressive u. regressive Metamorphosen des astrozytaren Glia. Z. ges. Neurol. Psychiat., 147, 489, 1933. — Schulz R. L., E. A. Maynard a. D. C. Pease. Electron microscopy of neurons and neuroglia of cerebral cortex a. Corpus callosum. Am. J. Anat., 100, 369, 1957. — Serra M. Nota sobre las gliofibrilas de la neuroglia de la rana. Trab. del Lab. de Inv. Biol., 19, 217, 1922. — Torack R. M., R. D. Terry a. H. Zimmermann. The fine structure of cerebral fluid accumulations: I Swelling secondary to cold injury. Am. J. Pathol., 35, 1135, 1959. — Windle W. E. (ed.) Biology of neuroglia. Springfield. Ill. Ch. C. Thomas, 340, 1959. — Weed H. The Meninges. In Cytology & Cellular Pathology of the Nervous System. Ed. by W. Penfield. Hoeber, N.-Y. 613, 1932. — Wolff J. Beiträge z. Ultrastruktur der Kapillaren in der normalen Grosshirnrinde. Z. Zellf., 60, 409, 1963. — Wolgram F., A. S. Rose. The morphology of neuroglia in tissue culture with comparisons to histological preparations. J. Neuropath., Exptl. Neurol., 16, 4, 514. 1957.

THE PROBLEM OF THE BIOLOGIC SPECIFICITY OF GLIO-EPENDYMAL TISSUE

K. Pöldvere

Summary

The author gives a critical review of the literature and his own observations dealing with the biologic specificity of the gliopendymal tissue in phylo- and ontogenesis as well as under normal, pathological and experimental conditions. Special attention is paid to results obtained by tissue cultivation. The author comes to the conclusion that in all the conditions studied the various elements of the gliopendymal tissue maintain their biological specificity. This specificity is considered as a result of different determination of these elements, but not as an expression of morpho-physiological plasticity or capacity to modulation.

РОСТ И ПРЕВРАЩЕНИЕ ПОКРОВНЫХ КЛЕТОК СОСУДИСТОГО СПЛЕТЕНИЯ МОЗГА В ПЕРВИЧНЫХ ТРИПСИНИЗИРОВАННЫХ КУЛЬТУРАХ

М.-А. А. Кооль

Центральная медицинская научно-исследовательская лаборатория Тартуского государственного университета

Клетки сосудистого сплетения, хотя и относятся к глиоэпендимальной ткани, значительно отличаются от других элементов этой ткани своей резко выраженной эпителиальностью. У человеческого плода эти клетки дифференцируются уже на пятой неделе внутриутробного развития. Поэтому особенно интересным является изучение биологической специфичности покровных клеток сосудистого сплетения как в отношении сохранения эпителиальных признаков, так и наличия признаков глио-эпендимальной ткани в тканевых культурах.

До сих пор сосудистые сплетения мозга культивировались только кусочковыми эксплантатами (В. П. Михайлов, 1938, Шлудерман — Schludermann, 1938; Хог — Hogue, 1948, 1949; Кэмерон — Cameron, 1953; Лумсден — Lumsden, 1958; Пирс Соарс — Pires Soares, 1960). По данным этих работ клетки покровного эпителия сосудистого сплетения сохраняют в одних случаях в культурах свою полигональность и эпителиальный характер. В других случаях, особенно при энергичном митотическом размножении, в культурах образуются нейроглиоподобные клетки. Исходя из этого, Н. Г. Хлопин (1946) отнес эпителий сосудистых сплетений к группе глио-эпендимальной ткани.

В связи с известными отличиями трипсинизированных тканевых культур от кусочковых (отсутствие внутритканевых и межклеточных корреляций в начале культивирования), изучение трипсинизированных культур сосудистого сплетения представляет значительный интерес.

Для приготовления трипсинизированных культур мы использовали сосудистые сплетения 23 человеческих плодов в возрасте IV—VIII месяцев, из которых дали рост 11. Тканевые культуры изготавливались спустя 3—21 час после смерти плода. Применялась смесь трипсина (0,25%) с панкреатином (0,25%) в соот-

ношении 3:1 при комнатной температуре. Клетки суспендировали в среде в концентрации 100 000—500 000 клеток в мл. Клеточную взвесь по 1 мл разливали в флаконы из-под пенициллина с кусочками покровных стекол. Флаконы в закупоренном виде инкубировали при 37,5° в термостате. В качестве питательной среды служила смесь: синтетическая среда № 199 15—20%, чело-веческая плацентарная сыворотка 15—20% и физиологический раствор Хэнкса 60%. К среде добавляли стрептомицин и пенициллин по 100 ед. на 1 мл. Питательную среду меняли на первый—второй день после посева и дальше по необходимости, судя по изменению рН среды.

Культуры рассматривались ежедневно под микроскопом. Для изготовления постоянных препаратов кусочки покровных стекол в разные сроки после посева извлекали из флаконов и после фиксации жидкостями Максимова, Карнуа и Ценкера окрашивали гематоксилином Гейденгайна и Вейгерта. Нуклеиновые кислоты выявляли реакцией Фёлгена после фиксации жидкостью Карнуа или окрашивали тионином по Эриксону. Липиды окрашивали после фиксации жидкостью Бэкера. Гликоген и кислые полисахариды выявляли по методу ШИК и Шимицу и Кумамото. Активность кислой фосфатазы определялась после фиксации жидкостью Бэкера методом Гомори в модификации Гольта. Активность щелочной фосфатазы определялась после фиксации жидкостью Бэкера методом Гомори.

Активность АТР-азы определялась на нефиксированном материале методом Падикула и Хермана (Padykula a. Herman). Активность сукциндегидрогеназы определялась на нефиксированном материале с нитро-СТ методом Нахласа и др. (Nachlas a. oth., 1957). Активность цитохромоксидазы определялась на нефиксированном материале методом Кейлина и Хертри (Keilin a. Hartree) в модификации Муга (Moog), активность неспецифической эстеразы — методом с применением α -нафтилацетата.

Живые клетки изучались и в фазово-контрастном микроскопе.

В начале развития культуры клетки изолированы друг от друга, но по мере размножения они соединяются между собой. На первых порах клетки были веретенообразные, похожие на культуры фибробластов. На 5—6 день наблюдалось образование непрерывных клеточных мембран на стекле (рис. 1). Кончается и гистотипическая дифференциация клеток. Клетки становятся более крупными, приобретают полигональную форму с несколькими протоплазматическими отростками, при помощи которых они соединяются. Этими отростками клетки напоминают астроциты в культуре, но, в отличие от них, клетки более эпителиоподобные и отростки более короткие (рис. 2). На 8—10 день культивирования наступает дегенерация клеток, характеризующаяся прежде всего ожирением (рис. 3).

Основным способом размножения клеток сосудистого сплетения в культуре оказалось митотическое деление. Оно наиболее высокое в первые 5—6 дней культивации. Отдельные митозы встречаются и в дегенерирующих культурах. Весьма интересно появление аномальных митозов и возникновение полиплоидии в культурах, особенно на 5—10 день культивации. Амитозы обыкновенно протекают без плазмотомии, образуются многоядерные гигантские клетки. Удалось зафиксировать и эндомиотоз (рис. 4).

Теперь остановимся на некоторых результатах цитологического и цитохимического исследования цитоплазмы в данных культурах. В культуре покровных клеток цитоплазма разделена на эндо- и эктоплазму. В эндоплазме встречается много органоидов и включений. Эндоплазма в общем базофильная, только центроплазма лишена базофильности. В центроплазме мало липидных гранул, которые скопляются вокруг ядра и центроплазмы в виде венчика. В фазово-контрастном микроскопе видно множество митохондрий и гранул. Среди последних, особенно вблизи ядра, обнаруживаются гранулы с активностью кислой фосфатазы (рис. 5). Эти гранулы варьируют по величине, а также по распределению в разных клетках. Крупные гранулы распределяются более диффузно, а мелкие в основном скопляются в области центроплазмы (рис. 6). Как известно, выявлением активности кислой фосфатазы идентифицируют лизосомы (Новиков — Novikoff, 1960, 1961). Представляет интерес динамика распределения гранул с активностью кислой фосфатазы во время развития культуры. В первые три дня отмечается относительно низкая активность этого фермента, которая выявляется мелкими гранулами. В дальнейшем их число увеличивается. На 5—6 день появляются крупные гранулы. Последние наблюдаются особенно много при дегенерации культуры. Крупные гранулы Новиков (1960) называет цитолизосомами и считает их выражением внутриклеточного автолиза. Этим можно объяснить увеличение числа крупных гранул при дегенерации культур. Активность щелочной фосфатазы выявляется клеточным мембраном и иногда в ядрышке. Кроме того в старых культурах отмечаются и интрацеллюлярные крупные гранулы с активностью щелочной фосфатазы (рис. 7).

Аналогично щелочной фосфатазе выявляется активность АТР-азы в клеточных мембранах. Диффузно окрашивается также ядро. Интрацеллюлярные гранулы с активностью АТР-азы выявляются раньше и в дальнейшем в более значительном количестве, чем гранулы с активностью щелочной фосфатазы той же локализации (рис. 8).

Активность цитохромоксидазы (рис. 9) и сукциндегидрогеназы (рис. 10) выявляется гранулами в митохондриях (рис. 11, 12). По нашим наблюдениям отмечается интенсивная

активность сукциндегидрогеназы уже на второй день культивирования (рис. 13). Таким образом мы не подтвердили данные В. Г. Заславского и А. М. Амченковой (1961), полученные на первичных культурах амнионовой оболочки, и В. Г. Заславского (1961) на первичных культурах обезьяны. Во время развития культур сосудистого сплетения отмечается повышение активности этого фермента (рис. 10), которая опять явно падает при дегенерации клеток. Высока также активность неспецифической эстеразы (рис. 14).

В клетках обнаруживается много ШИК-положительных гранул (рис. 15), но отсутствует гликоген. Об этом свидетельствует слюнорезистентность этих гранул. Такие же данные мы обнаружили и при помощи метода с применением тетрацетата свинца. Можно заключить, что эти гранулы имеют мукопротеидный характер. После блокирования бромом в клетках еще выявляются ШИК-положительные гранулы, что свидетельствует о наличии этиленовых, гидроксильных и аминокислотных групп. Основная часть ШИК-положительных гранул совпадает по своей локализации с гранулами с активностью кислой фосфатазы (лизосом).

На всех рисунках покровные клетки сосудистого сплетения мозга человеческих плодов в первичных трипсинизированных культурах.

Рис. 1. Пятый день после посева. Максимов. Гематоксилин Гейденгайна. Об. 20, ок. 10.

Рис. 2. Седьмой день после посева. Микроскоп фазового контраста. Об. 70, ок. 10.

Рис. 3. Девятый день после посева. Бэкер. Судан черный в пропиленгликоле. Об. 90, ок. 10.

Рис. 4. Шестой день после посева. Эндомитоз. Карнуа. Тионин Об. 90, ок. 10.

Рис. 5. Пятый день после посева. Активность кислой фосфатазы. Бэкер. Метод Гомори в модификации Гольт. Об. 90, ок. 10.

Рис. 6. Пятый день после посева. Такая же клетка витально в микроскопе фазового контраста Об. 70, ок. 10

Рис. 7. Девятый день после посева. Активность щелочной фосфатазы. Бэкер. Метод Гомори. Об. 90, ок. 10.

Рис. 8. Девятый день после посева. Активность АТФ-азы. Метод Падикула и Хермана. Об. 90, ок. 10.

Рис. 9. Восьмой день после посева. Активность цитохромоксидазы. Метод Кеймена и Хертри в модификации Муга. Об. 90, ок. 10.

Рис. 10. Шестой день после посева. Активность сукциндегидрогеназы. Метод Нахласа и др. Об. 90, ок. 10.

Рис. 11. Шестой день после посева. Митохондрии. Рего. Импрегация методом Фуджий. Об. 90, ок. 10.

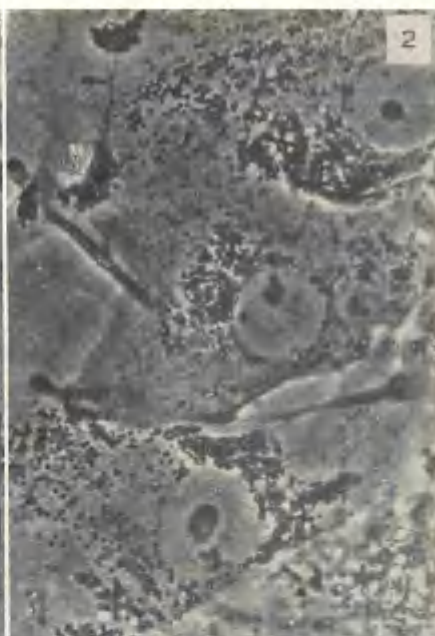
Рис. 12. Пятый день после посева. Такая же клетка витально в микроскопе фазового контраста. Об. 70, ок. 10.

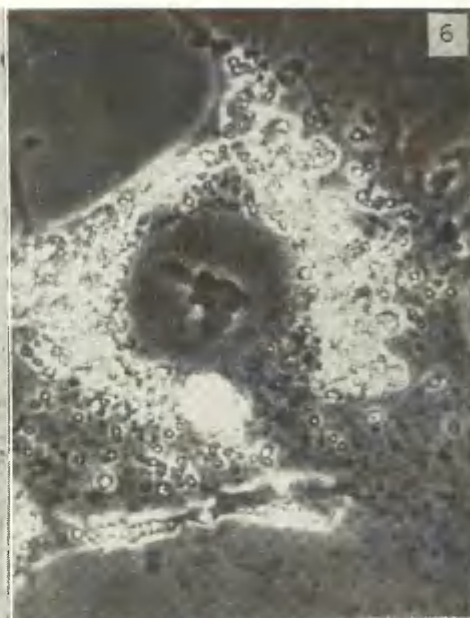
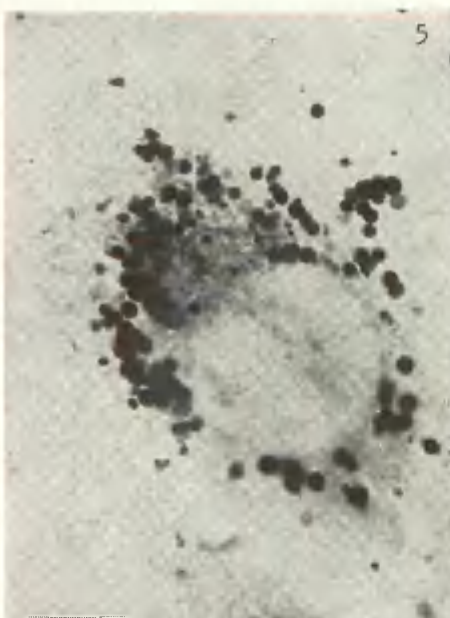
Рис. 13. Второй день после посева. Активность сукциндегидрогеназы. Методы Нахласа и др. Об. 90, ок. 10.

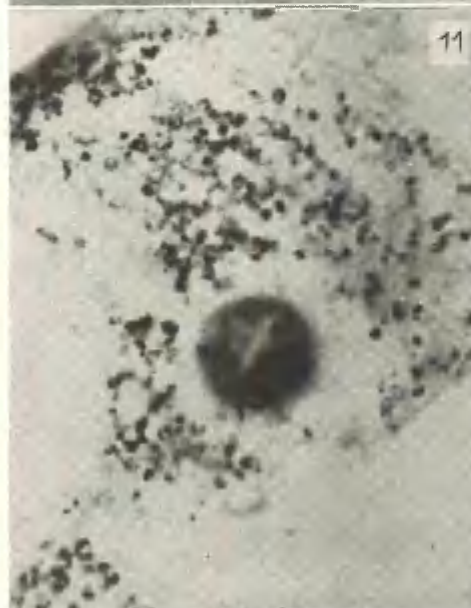
Рис. 14. Шестой день после посева. Активность неспецифической эстеразы. Бэкер. Метод с применением α -нафтилацетата. Об. 90, ок. 10.

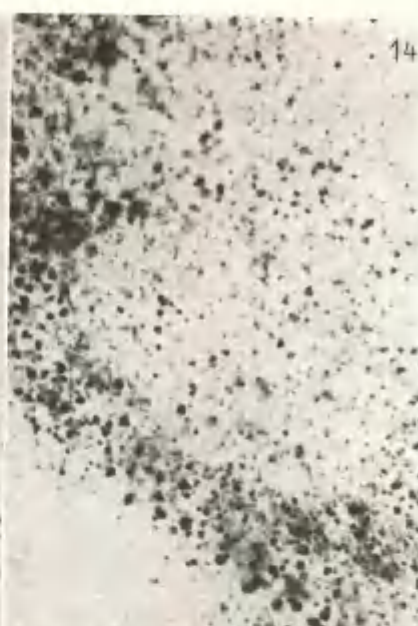
Рис. 15. Шестой день после посева. ШИК-положительные гранулы. Карнуа. ШИК-реакция. Об. 90, ок. 10.

Рис. 16. Седьмой день после посева. Эритрофагоцитоз. Максимов. Гематоксилин Гейденгайна. Об. 90, ок. 10.









Клетки сосудистого сплетения в культуре способны к фагоцитозу, о чем свидетельствует встречающийся эритрофагоцитоз. При этом отмечается скопление лизом на поверхности эритроцитов (рис. 16).

Какое биологическое значение в жизнедеятельности клетки имеет отмеченная нами высокая активность многих ферментов? С одной стороны, эти ферменты могут иметь значение для метаболизма клетки в связи с особыми условиями существования в культуре. С другой стороны, это может быть связано с биологической специфичностью клеток и с вторичной дифференцировкой в ее рамках. Для выяснения этого требуются обширные сравнительные исследования многих тканей. Все же на основе предварительного опыта нашей лаборатории можно сопоставить высокую активность исследованных нами ферментов в культуре клеток покровного эпителия сосудистых сплетений с высокой активностью ферментов в сосудистом сплетении *in vivo*, как это было нами показано раньше (М.-А. Старкопф, 1964).

Сравнивая наши данные с литературными данными о культивировании кусочков, можно прийти к заключению, что рост и дифференцировка покровных клеток сосудистых сплетений в трипсинизированных клетках в основном не отличается от кусочковых эксплантатов. Имея характер глио-эпендимальной ткани, они вместе с тем сохраняют свою более узкую тканевую специфичность.

ЛИТЕРАТУРА

Заславский В. Г., А. М. Амченкова. Цитохимическое изучение активности сукциндегидразы в культивируемых вне организма клетках. Бюлл. эксп. биол. и мед., 1, 91, 1961. — Заславский В. Г. Сравнительное цитохимическое изучение активности сукциндегидразы и щелочной фосфатазы в клетках первично-эксплантированных и перевиваемых тканевых культур. Бюлл. эксп. биол. и мед., 2, 207, 1961. — Михайлов В. П. Рост и превращение *in vitro* покровных клеток сосудистых сплетений мозга. ДАН нов. сер., 18, 2, 121, 1938. — Старкопф М. А. О гистохимии сосудистого сплетения мозга. Научн. труды высших учебных заведений Литовской ССР, медицина V, 309, 1964. — Хлопин Н. Г. Культура тканей. Л., 1940. — Хлопин Н. Г. Общебиологические и экспериментальные основы гистологии. Л., 1946. —

Cameron G. Secretory activity of the choroid plexus in tissue culture. Anat. Rec., 117, 115, 1953. — Hogue M. J. Human fetal choroid plexus cells grown in tissue cultures. Anat. Rec., 100, 675, 1948. — Hogue M. J. Human fetal choroid plexus cells in tissue cultures. Anat. Rec., 130, 381, 1949. — Hogue M. J. Human fetal choroid plexus cells in tissue cultures. Anat. Rec., 100, 674, 1958. — Holt S. J. Factors governing the validity of staining methods for enzymes and their bearing upon the Gomori acid phosphatase. Exptl. Cell Res., suppl. 7, 1, 1, 1959. — Lumsden C. E. Ciba Foundation Symposium of the cerebrospinal fluid. 97, 1958. — Nachlas M. M.,

Kwang-Chung Tsou, E. de Souza, Chao-Shing Cheng, A. M. Seligman. Cytochemical demonstration of succinic dehydrogenase by the use of a new nitrophenyl substituted ditetrazole. *J. Histochem. a. Cytochem.*, 5, 4, 420, 1957. — Novikoff H. Developing cell systems and their control. 1960. — Novikoff H. The cell II. N.-Y.-London, Acad. Press 1961. — Pires Soares J. M. Plexus choroides d'embryons du poulet. *Arch. portug. des sciences biologiques*, XII, fasc. I, 1960. — Schludermann K. Flimmerepithel der Plexus choroidei von Hünchen in der Gewebekultur. *Zeitschr. mikrosk.-anat. Forsch.*, 44, 163, 1938.

GROWTH AND TRANSFORMATION OF THE COVERING CELLS OF THE VASCULAR PLEXUSES OF THE BRAIN IN PRIMARY TRYPSINIZED CULTURES

M.-A. Kool

Summary

A study of primary trypsinized cultures covering cells of the vascular plexuses of the brain of man was carried out. There are formed epithelium-like membranes consisting of polygonal or stellate-like cells connected with one another by short plump processes. As compared with neuroglia cultures, the covering cells of plexuses in vitro differ in their greater similarity to epithelium. Growing in the manner of glio-ependymal tissue, the cells under study maintain their specificity.

ЗНАЧЕНИЕ ПЕРИАКСОНАЛЬНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКИХ НЕРВНЫХ ВОЛОКОН ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПРОЦЕССОВ ДЕМИЕЛИНИЗАЦИИ

Ю. М. Жаботинский, В. Ф. Мельникова

Лаборатория патологии нервной системы отдела патологической анатомии
Института экспериментальной медицины АМН СССР

В настоящем сообщении приводятся имеющиеся в нашем распоряжении материалы исследований одного из двух важнейших патологических процессов в нервных волокнах, а именно — материалы периаксональных сегментарных изменений. Сегментарная дегенерация или периаксональный неврит Гомбо (Gombault, 1880—1881), как известно, характеризуется почти избирательным поражением миелиновой оболочки без существенных изменений осевого цилиндра, причем распад миелина обычно происходит на ограниченном протяжении, захватывая один или несколько сегментов.

В то время как динамика развития изменений при вторичной (валлеровской) дегенерации периферических нервных волокон весьма подробно изучена в световом и электронном микроскопе (Б. С. Дойников, 1922; Р. и Кахаль — R. y Cajal, 1928; Оми — Ohmi 1961; Вебстер — Webster, 1962, и др.), а также гисто- и биохимически, в отношении периаксонального процесса в миелиновых волокнах наши сведения крайне скудны. Это зависит, в первую очередь, от трудностей получения его экспериментальным путем, которые прежде имели место.

Вместе с тем, о значении изучения периаксонального процесса говорит его наличие при многочисленных демиелинизирующих заболеваниях центральной и периферической нервной системы человека и животных. Почти избирательное поражение миелиновой оболочки при сохранности осевого цилиндра уже приводит к резким нарушениям функции нервного волокна.

Изучение миелинизации и демиелинизации центральных и периферических нервных волокон важно не только для выяснения закономерностей развития и распада миелиновой оболочки и сопоставления на различных этапах с функциональным их

созреванием или, наоборот, с потерей их функции, но и для получения более точных данных о морфологической и химической структуре миелина. Эти исследования нередко дают ключ к пониманию тонких структурных взаимоотношений. Так, например, сложные взаимоотношения между шванновскими клетками и миелиновой оболочкой удалось показать уже в световом, а позже в электронном микроскопе, как раз наиболее четко при валлеровском перерождении, когда происходит резкая гипертрофия шванновских клеток, цитоплазматические отростки которых пронизывают миелиновую оболочку, достигая осевого цилиндра.

Прежде чем перейти к непосредственному изложению данных о морфологических изменениях при периаксональном процессе, мы считаем необходимым высказать некоторые соображения в отношении применяемых в этих случаях методик. Конечно, только правильный выбор гистологических методик дает возможность правильно оценивать наблюдающуюся патоморфологическую картину. Однако некоторые широко используемые при исследовании патологии миелиновой оболочки методики нередко приводят к неправильным выводам, а подчас и к грубым ошибкам. Например, при изучении изменений миелина отдельные авторы считают возможным оценивать препараты на основании импрегнации серебром, что совершенно недопустимо, и мы на этом не будем останавливаться.

Кроме того, следует подчеркнуть, что даже методы, весьма ценные для изучения нормального строения миелина или массовой демиелинизации нервных волокон, оказываются мало или вообще непригодными для исследования изменений в отдельных нервных волокнах.

Так, для изучения периаксонального демиелинизирующего процесса часто применяются методика Вейгерта или ее модификации, особенно методика Шпильмейера. Все эти методики основаны на очень стойкой окраске гематоксилином миелина после протравы последнего солями тяжелых металлов (напр., хрома, меди и т. п.) с образованием т. н. «лаков». Они дают четкую картину только в отношении наличия или отсутствия миелиновой оболочки, но при них получаются мало убедительные картины для оценки распада миелина в отдельных волокнах, в частности, при периаксональном процессе. Для примера мы приведем две микрофотограммы одного и того же случая экспериментального аллергического полиневрита с резко выраженными периаксональными изменениями в нервных волокнах чувствительных ганглиев. При импрегнации среза осмием по Марки отчетливо виден распространенный, преимущественно мелкозернистый, распад миелина нервных волокон (рис. 1). На другой микрофотограмме при окраске по очень хорошей методике Кульчицкого, являющейся также модификацией метода Вей-

герта, более или менее отчетливых изменений в отдельных нервных волокнах обнаружить не удастся (рис. 2). Часто при этом методе окраска ядер клеточных элементов, в частности, воспалительных, еще больше затрудняет оценку морфологической картины.

Только в результате массовой гибели миелина многих нервных волокон эти методики показывают участки демиелинизации. При этом следует иметь в виду, что и в этих случаях только добавочное применение импрегнации серебром аксонов, а также обычных клеточных окрасок может дать правильный ответ, имеем ли мы дело с истинной демиелинизацией, т. е. разрушением миелина при сохранившихся аксонах, или же с гибелью всех структур волокна, или даже с некрозом ткани.

Возможности для ошибочных заключений особенно велики при широко применяемой в настоящее время методике Шпильмейера. При этой методике дополнительно возникают трудности в оценке морфологической картины из-за часто наблюдающихся артефициально образующихся не окрашенных гематоксилином участков нервной ткани, симулирующих демиелинизацию. В таких случаях неокрашенные (или слабо окрашенные) места появляются в результате неравномерной протравы солями тяжелых металлов отдельных участков нервной ткани, вследствие чего здесь гематоксин не образует стойких соединений с миелином. В качестве примера мы приведем две микрофотограммы двух срезов из одного и того же сегмента спинного мозга человека при карциноматозе мозговых оболочек. При окраске по Вейгерту отчетливо видна нормальная картина поперечного разреза спинного мозга с типичной светлой «бабочкой» серого вещества, из-за малого количества в нем миелиновых волокон, и с более темно окрашенным белым веществом, совершенно нормальным по своему поперечнику (рис. 3). На другой микрофотограмме с препарата из этого же сегмента спинного мозга при окраске по Шпильмейеру, наряду с закраской серого вещества, в белом веществе видны крупные неокрашенные участки, симулирующие демиелинизацию (рис. 4). На основании таких дефектных окрасок отдельные авторы допустили грубую ошибку в отношении процесса демиелинизации при некоторых нейровирусных энцефаломиелитах.

Наиболее подходящими методиками для исследования периаксонального процесса следует считать импрегнацию продуктов распада миелина осмием по Марки, а для более поздних стадий — окраску на нейтральные жиры и жирные кислоты. Если до недавнего времени полагали, что методика Марки не является гистохимической методикой и что на основании ее нельзя судить о том, какие продукты распада миелина импрегнируются осмием в черный цвет, то теперь опубликованы весьма убедительные данные, что эта импрегнация зависит от образования

холестеринэстеров. Наши наблюдения в отношении периаксонального процесса также дают основания присоединиться к этому взгляду.

Продуктивное изучение периаксонального процесса в динамике стало возможным только после создания экспериментальной модели демиелинизирующих процессов в центральной и периферической нервной системе в результате вызывания аллергиями нервной ткани экспериментального аллергического энцефалита или полиневрита.

Мы не будем особо останавливаться на технике вызывания этого аллергического демиелинизирующего процесса в периферических или центральных нервных волокнах. Отметим лишь, что он носит весьма избирательный характер, существенно не вовлекая в патологический процесс ни тело нейрона, ни осевой цилиндр. Таким образом, мы имеем типичный периаксональный демиелинизирующий процесс, столь характерный для многих демиелинизирующих заболеваний центральной и периферической нервной системы человека и отчасти животных.

Эксперименты на 60 кроликах, которым однократно подожжено в подушечки пальцев четырех конечностей вводилась эмульсия ткани гомологичных периферических нервов со стимулятором Фрейнда, дали возможность проследить развитие периаксонального процесса в периферических нервных волокнах с самых начальных стадий до более позднего периода, когда можно было наблюдать ремиелинизацию нервных волокон.

Характер изменений миелина при периаксональном процессе уже с самых начальных стадий резко отличается от морфологической картины, наблюдаемой при валлеровской дегенерации нервных волокон.

В противоположность патоморфологической картине распада миелина на отдельные крупные фрагменты в начале валлеровской дегенерации (рис. 5), в пораженных нервных волокнах при периаксональном процессе уже с самого начала заметно очень раннее появление в миелиновой оболочке мелкой зернистости, импрегнирующей осмием по методике Марки в черный цвет (рис. 6). Обычно распад миелина начинается вблизи перехватов Ранвье, но он быстро распространяется на весь сегмент.

Нам ни разу не удалось установить, что этому мелкозернистому распаду предшествует повышенное накопление в миелине эльцгольцевских телец.

Процесс мелкозернистого распада миелина происходит очень быстро, и сравнение его в различные сроки как до появления симптомов поражения нервов, так и в самые ранние сроки их обнаружения дает все основания считать, что его бурное развитие происходит в течение нескольких часов и достигает максимума в один—два дня.

Это совершенно отличный от валлеровского перерождения процесс, т. к. при последнем даже в течение первой недели после отделения нервных волокон от их трофических центров в нервных клетках происходит только фрагментация миелина на крупные отрезки без улавливаемых химических изменений в них (Л. И. Фалин, 1954), вследствие чего в этот недельный срок в миелине отсутствуют продукты распада, импрегнируемые осмием в черный цвет.

Только к концу первой — началу второй недели в нем появляются крупные шары распада миелина, импрегнирующиеся осмием в черный цвет, в дальнейшем образуются и более мелкие зерна распада.

Вследствие быстро протекающих изменений в миелине при периаксональном процессе, продукты его распада, приблизительно уже через 3—4 дня, частично начинают более бледно импрегнироваться по Марки в сероватый цвет, и появляются окрашиваемые суданом и шарлах-рот мелкие зерна (рис. 7). При этом одновременно происходит еще большее измельчение зернистости и постепенное уменьшение ее количества.

Некоторые другие гистологические и гистохимические методики также указывают на очень быстро наступающие и глубокие химические изменения миелина.

До самого последнего времени большинство авторов считало, что при распаде миелина осмий импрегнирует в черный цвет уже продукты распада липидов, достигшие стадии жирных кислот и нейтральных жиров. В последние годы появились сообщения Адамса (Adams, 1958), что в начале процесса распада миелина при валлеровском перерождении образуются гидрофобные холестеринэстеры, которые также способны импрегнироваться осмием в черный цвет. Полученные нами данные при периаксональном процессе указывают, что очень быстро образующийся мелкозернистый распад, импрегнирующийся осмием в черный цвет, не достиг еще стадии жирных кислот и нейтрального жира и поэтому не окрашивается обычными окрасками на жиры, как шарлах-рот и судан III. Тем не менее есть основания полагать, что этот распад содержит холестеринэстеры, которые и импрегнируются осмием в черный цвет.

В связи с этими данными об образовании в начале химических изменений миелина холестеринэстеров, которые отсутствуют в нормальном зрелом миелине, интересно подчеркнуть, что при миелинизации волокон сначала в них можно обнаружить холестеринэстеры, которые исчезают по мере созревания нервных волокон, и в миелине зрелых волокон можно обнаружить только холестерин. В ряде работ на основании химических, гистохимических и хроматографических исследований развивающейся центральной нервной системы человека и цыплят было показано, что на ранних стадиях миелинизации, в противополож-

ность зрелому миелину, значительная часть холестерина находится в виде эфиров (Адамс и Дависон — Adams a. Davison, 1959 и др.).

Распад миелина приводит к полной демиелинизации нервных волокон на некотором протяжении, что можно хорошо проследить при применении методики Вейгерта и ее модификаций.

Состояние осевых цилиндров этих волокон можно оценивать при импрегнации серебром, но на основании последней ни в коем случае нельзя устанавливать наличие демиелинизации нервных волокон.

При глубоких поражениях миелиновой оболочки иногда можно обнаружить изменения осевого цилиндра, которые выражаются в локальном изменении его калибра, деформации, разволокнении, смещении, гипер- или гипоимпрегнации, а также в регенераторных явлениях с образованием выростов, ветвящихся побегов с концевыми утолщениями и т. п.

Нередко термин «демиелинизация» неправильно употребляют и в тех случаях, когда, при применении специальных методик для миелина, последний не окрашивается вследствие распада всего нервного волокна вместе с осевым цилиндром, что имеет место при валлеровском перерождении или некрозе ткани.

Вторую характерную черту периаксонального процесса составляют значительная пролиферация и гипертрофия шванновских клеток, в телах которых продукты распада миелина могут находиться весьма длительное время.

Этот реактивный процесс постепенно, но обычно довольно быстро, нарастает по мере усиления периаксональных изменений (рис. 8). Однако, как показали наши исследования, при периаксональной дегенерации нервных волокон чувствительных ганглиев при экспериментальном аллергическом полиневрите у кролика даже при значительном распаде миелина заметные реактивные явления со стороны шванновских клеток еще могут отсутствовать, но в дальнейшем они обычно принимают весьма интенсивный характер.

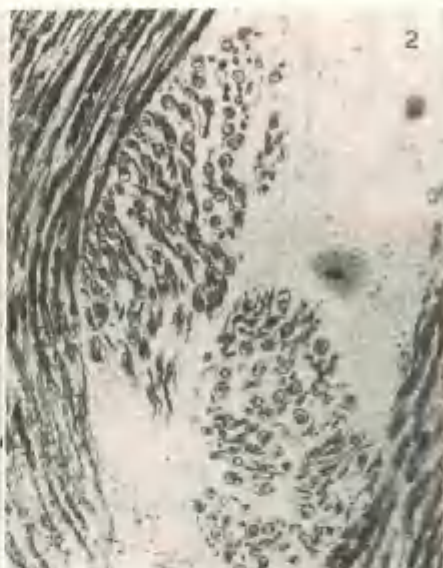
Гипертрофированные шванновские клетки имеют крупные, большей частью веретенообразные тела, цитоплазма которых решетчатого строения, а ядро содержит несколько увеличенное

Рис. 1. Мелкозернистый распад миелина в нервных волокнах чувствительного ганглия шейного отдела спинного мозга при экспериментальном аллергическом полиневрите. Методика Марки.

Рис. 2. Нормальный вид миелиновых нервных волокон в чувствительном ганглии шейного отдела спинного мозга в том же случае экспериментального аллергического полиневрита, что и на рисунке № 1. Методика Кульчицкого.

Рис. 3. Нормальная картина поперечника спинного мозга человека при карциноматозе мозговых оболочек. Методика Вейгерта. (Препарат И. П. Бабчиной).

Рис. 4. Артефициальные участки демиелинизации и закрашка серого вещества в том же сегменте спинного мозга, что и на рисунке № 3. Методика Шпильмейера. (Препарат И. П. Бабчиной).





количество зернышек хроматина. Эти гипертрофированные шванновские клетки, как и при валлеровском перерождении, расположены в виде тяжей вдоль отрезков пораженных нервных волокон.

При сопоставлении препаратов Марки и Ниссля из сходно пораженных ганглиев одного и того же животного можно установить, что мелкозернистый распад в основном происходит в гипертрофированных телах шванновских клеток.

Шванновские клетки могут превращаться в макрофаги, содержащие продукты распада. В противоположность валлеровской дегенерации, мезенхимные элементы принимают сравнительно малое участие в уборке продуктов распада миелина.

• При вызывании экспериментального аллергического полиневрита с периаксональным распадом миелина в пораженных участках периферической нервной системы, в первую очередь, в чувствительных ганглиях, нередко можно наблюдать более или менее выраженные воспалительные явления. В связи с этим возникает естественный вопрос, не связаны ли наблюдающиеся периаксональные изменения с одновременно развивающимся воспалительным процессом, т. е. не представляют собой чистый периаксональный процесс. Просмотр большого материала, особенно изучение более ранних стадий патологических изменений, с бесспорностью показывает, что периаксональный процесс возникает первично и далеко не всегда сопровождается воспалительными явлениями, даже в резко выраженной форме. При резко выраженном периаксональном процессе всегда можно наблюдать реакции со стороны шванновских клеток, а воспалительная реакция часто отсутствует. Наличие воспалительного процесса в периферической нервной системе без распада миелина нам ни разу не удалось обнаружить.

Из приведенных данных следует, что как в отношении характера распада миелина, так и скорости развития этого процесса при периаксональной дегенерации наблюдаются резкие отличия от того, что имеет место при валлеровской дегенерации, хотя при последней нервное волокно полностью отделяется от трофического центра — тела нервной клетки, — и гибнет осевой ци-

Рис. 5. Начальные стадии распада нервных волокон при валлеровском перерождении с образованием крупных фрагментов миелина и небольшого количества больших шаров, импрегнирующихся осмием в черный цвет.

Методика Марки.

Рис. 6. Сильный мелкозернистый распад миелина нервных волокон в чувствительном ганглии поясничного отдела спинного мозга кролика при экспериментальном аллергическом полиневрите. Методика Марки.

Рис. 7. Уменьшение интенсивности импрегнации осмием мелкозернистого распада миелина на 3 день развития симптомов экспериментального аллергического полиневрита. Методика Марки.

Рис. 8. Проплиферация и гипертрофия шванновских клеток при периаксональном процессе в нервных волокнах. Методика Ниссля.

линдр. Имеются отличия также в отношении процессов уборки продуктов распада, которые удаляются при периаксональном процессе почти исключительно шванновскими клетками, в то время как мезенхимные элементы почти совсем не участвуют в этом процессе.

Дальнейшее углубленное гистохимическое изучение продуктов распада миелина даст возможность выяснить и другие отличия их при периаксональном процессе по сравнению с валлеровской дегенерацией.

ЛИТЕРАТУРА

Дойников Б. С., Гистологические и гистопатологические исследования над периферическими нервами. Дисс., 1922. В «Избранных трудах по нейроморфологии и невропатологии», М., 1955. Фалин Л. И., Некоторые спорные вопросы морфологии и физиологии вторичной дегенерации периферических нервов. М., 1954. Adams C., Histochemical mechanisms of the Marchi reaction for degenerating myelin. *J. Neurochem.*, 1958, 2/3, 178. Adams C., Davison A., The occurrence of esterified cholesterol in the developing nervous system. *J. Neurochem.*, 1959, 4, 4, 282. Cajal R., Degeneration and regeneration of the nervous system. (Oxford Univ Press, 1928. Combault A., Contributions a l'étude anatomique de la névrite parenchymateuse subaigüe et chronique. Névrite segmentaire périaxiale. *Arch. de Neurol.* 1880/81, I, 77. Ohmi S., Electron microscopic study on Wallerian degeneration of the peripheral nerve. *Zeitschr. Zellforsch.*, 1961, 54, I, 39. Webster H., Transient focal accumulation of axonal mitochondria during the early stages of Wallerian degeneration. *J. Cell. biol.*, 1962, 12, 2, 361.

SIGNIFICANCE OF PERIAXONAL CHANGES IN PERIPHERAL NERVE FIBRES FOR THE STUDY OF THE DEMYELINIZATION PROCESS

J. M. Jabotinsky, V. F. Melnikova

Summary

The model of experimental allergic polyneuritis was used in rabbits for studying periaxonal segmentary degeneration in peripheral nerve fibers. The process under study is characterized by rapid primary fragmentation of myelin into minute birefringent particles which give a positive March reaction during the first 2—3 days after the onset of the degeneration. The fragmentation of myelin is accompanied by proliferation and hypertrophy of Schwannian cells absorbing products of myelin decomposition.

The differences in morphology of periaxonal degeneration from the Wallerian one and the value of various histological methods for the study of demyelination are discussed.

ЦИТОЛОГИЧЕСКОЕ И ГИСТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ РЕАКТИВНЫХ ПРОЦЕССОВ В НЕВРОНАХ ГОЛОВНОГО МОЗГА ПРИ НЕЙРОВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Г. В. Коновалов

Лаборатория патологии нервной системы отдела патологической анатомии
Института экспериментальной медицины АМН СССР

Морфологические исследования реактивных процессов в нейронах в последнее время привлекают особенно большое внимание. Если раньше в основном изучались патологические изменения в различных структурах нейрона, то теперь в центре внимания стали реактивные процессы, стоящие на грани с физиологическими.

Среди реактивных изменений в нейронах особое значение имеют цитоплазматические оксифильные включения, образующиеся в результате проникания различных нейровирусов в клетку. Хотя изучение оксифильных включений ведется с начала настоящего столетия, однако их генезис, структура, химический состав, а также связь с видом животного изучены совершенно недостаточно.

В настоящем сообщении приводятся результаты исследования реактивных изменений, особенно оксифильных цитоплазматических включений, в нейронах головного мозга песцов и белых мышей, зараженных родственными вирусами уличного бешенства и «дикования».

«Дикование» представляет собой близкое к бешенству заболевание, но по ряду клинических, эпидемиологических и морфологических признаков оно значительно отличается от последнего. Вирусологические исследования не позволили дифференцировать эти близкие нейровирусные инфекции.

Настоящее исследование проведено на песцах 3—6-месячного возраста и молодых белых мышках весом 6—7 г. Животные заражались различными штаммами вирусов уличного бешенства и «дикования», прошедших как небольшое число пассажей (1—3), так и длительное пассирование (14—15). Заражение животных производилось 10% вирусной суспензией внутримышечно, в ча-

сти случаев внутримозговым путем. Доза инфекционного материала составляла 3—4 log LD₅₀ вируса. Всего различными штаммами вируса бешенства и «дикування» было инфицировано 40 песцов и 60 белых мышей. Исследование оксифильных включений у песцов представляется важным потому, что эти животные являются естественными хозяевами изучаемых инфекций.

Микроскопическое изучение оксифильных телец и реактивных изменений в нейронах одновременно производилось в различных отделах головного мозга, что давало возможность установить топографию их распространения.

Материал для микроскопического исследования фиксировали в 10% нейтральном формалине, жидкости Дюбоск-Бразиль-Буэна и 96° спирте. Для выяснения структуры и химического состава оксифильных включений использовано большое количество общегистологических и специальных нейрогистологических методик (окраска азури-эозином, по Манну, Трубиной, Доминичи в модификации Пигаревского, по Адуцкевичу, Нисслю). Для выявления нуклеиновых кислот применены гистохимические методы исследования (окраска по Фельгену, Браше, акридиновым оранжевым).

У белых мышей при обеих инфекциях в нейронах различных отделов головного мозга были обнаружены оксифильные цитоплазматические включения (рис. 1). В большинстве случаев они имеют округлую или овальную форму и размеры их колеблются от 3—15 μ . Почти всегда они бывают единичными, и только в отдельных клетках обнаружено одновременно несколько более мелких оксифильных телец.

У белых мышей удалось проследить динамику образования и развития оксифильных телец. Как правило, оксифильные включения наиболее мелких размеров наблюдаются в перикарионе, они всегда гомогенно окрашены, и в них не удается обнаружить внутреннюю структуру. По мере увеличения размеров оксифильных включений они начинают занимать большую часть цитоплазмы и смещаются на периферию клеточного тела. При этом внутри у них удается обнаружить мелкие базофильные зерна, равномерно расположенные по всему оксифильному включению (рис. 2). Эти образования (базофильные зерна) в дальнейшем приобретают более крупные размеры. В отдельных случаях были обнаружены сформированные оксифильные тельца вне тела клетки. При этом в некоторых препаратах часть оксифильного включения находилась внутри клетки, а другая часть — вне ее (рис. 3).

Крупные оксифильные тельца, содержащие большое количество базофильных глыбок и зерен, обнаружены также внеклеточно. В части их можно было отметить различные стадии дегенерации: смазанность контуров, появление оксифильной зерни-

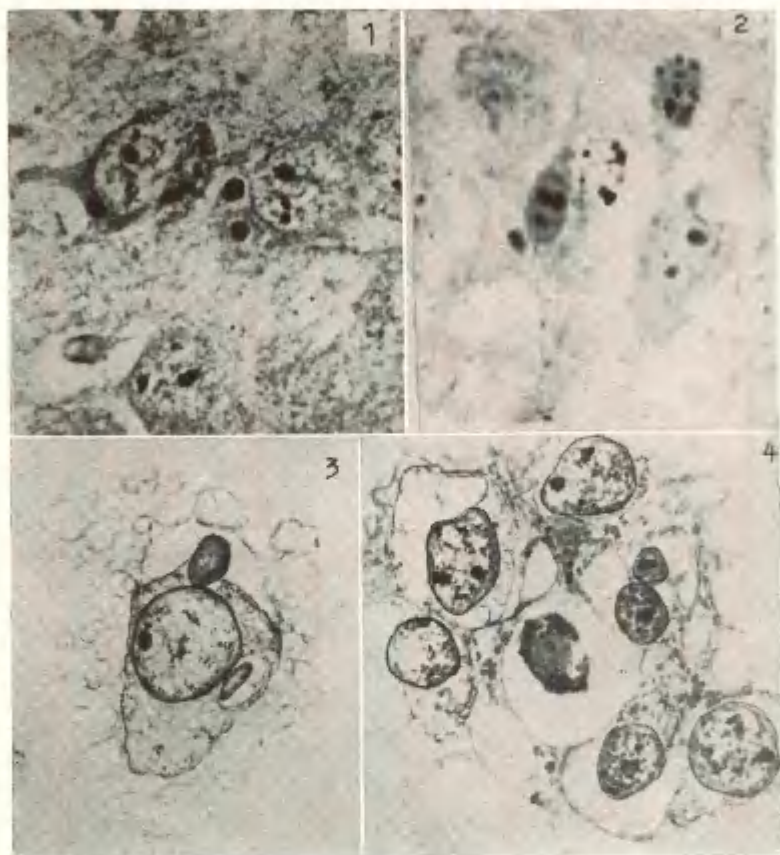


Рис. 1. Оксифильные включения в нейронах пирамидного слоя аммонова рога белой мыши. Окраска по Трубиной. Увел. 850.

Рис. 2. Оксифильные включения в нейронах пирамидного слоя аммонова рога белой мыши, содержащие базофильную зернистость. Окраска азур-эозином. Увел. 1900.

Рис. 3. Выход оксифильного включения из нейрона коры больших полушарий белой мыши в окружающую ткань. Окраска азур-эозином.

Рис. 4. Дегенеративные изменения оксифильных включений, расположенных внеклеточно. Окраска азур-эозином.

стости; базофильные зерна оксифильных включений при этом окрашиваются также значительно бледнее, становятся неотчетливыми, и в них появляются различных размеров полости. В конечной стадии дегенерации наблюдается распад (рис. 4) оксифильных телец.

В настоящей работе уделено большое внимание гистохимическому изучению включений. При окраске по методу Браше оксифильные включения окрашиваются пиронином, а базофильные глыбки и зерна в них — метиловым-зеленым. При просмотре препаратов, окрашенных акридиновым оранжевым, в люминесцентном микроскопе, большие участки оксифильных телец показывают интенсивное ярко-зеленое свечение. Акридиновый оранжевый приготавливался на фосфатном буфере Крепса-Рингера при pH 6,6. Обработка контрольных срезов ферментами подтвердила специфичность окрашивания нуклеиновых кислот. Таким образом, при окраске по Браше и акридиновым оранжевым было показано, что в оксифильных включениях имеются как ДНК, так и РНК. Однако при окраске по Фельгену ДНК в оксифильных включениях не была обнаружена.

До самого последнего времени существуют противоречивые данные в отношении химического состава оксифильных включений при бешенстве. Так, Вольман и Бехар (Wolman and Behar, 1952) нашли ДНК в тельцах Бабеша-Негри у белых мышей только на ранних стадиях их развития. Мултон (Multon, 1954) установил наличие ДНК во внутренних гранулах оксифильных телец, а Саренде (Sourander, 1956) вовсе не обнаружил в них нуклеиновых кислот. Соколов и Ванаг (1962), считают, что тельца Бабеша-Негри содержат ДНК, а внутри их имеются гранулы, состоящие из РНК.

За последние годы значительно расширились наши знания о природе включений при вирусных инфекциях. С помощью иммунофлюоресценции Гольдвассер с соавторами (Goldwasser a. oth., 1958—59) нашли, что тельца Бабеша-Негри содержат специфический антиген вируса бешенства. С помощью электронной микроскопии Ленин и Круасан (Lepine et Croissant, 1951) показали, что на обычных гистологических препаратах микрoколонии вируса бешенства имеют вид базофильных глыбок и зерен. Эти же структуры содержат ДНК (Лепин и Сотер — Lepine et Sautter, 1946). В наших гистохимических исследованиях включений при бешенстве и «дикувании» у белых мышей установлено наличие при обеих инфекциях отдельных зерен, положительно окрашивающихся на ДНК. По-видимому, эти базофильные зерна представляют собой колонии вируса, а оксифильная часть — видоизмененную часть цитоплазмы. Вольман и Бехар, а также Мултон, считают тельца Бабеша-Негри цитоплазматическими образованиями, ограничивающими вирус бешенства.

В большинстве случаев оксифильные включения у песцов и белых мышей были найдены в сравнительно мало измененных клетках. Эти данные совпадают с наблюдениями Джонсона (Johnson, 1955), указывающего на обильное образование телец Бабеша-Негри не при тяжелых паралитических формах болезни, а при более легко протекающей инфекции. Только очень редко включения располагались в пикноморфных нервных клетках с темным ядром и сморщенной цитоплазмой, но в этих случаях нельзя было исключить артефициального происхождения этих изменений.

При обеих инфекциях у песцов и белых мышей ни в одном случае оксифильные тельца не были обнаружены внутриядерно. В части невронов пирамидного слоя аммонова рога и коры больших полушарий, содержащих включения, наблюдается гипертрофия ядрышка, увеличение размеров и количества парануклеолярных телец, а также оксифильной зернистости ядра.

В проведенных исследованиях было установлено, что образование оксифильных включений в нейронах у различных видов животных при заражении одним и тем же нейровирусом неодинаково. Так, при инфицировании белых мышей мало- и многопассажными штаммами вируса «дикування» установлено, что у заболевших животных включения часто встречаются в цитоплазме невронов различных отделов головного мозга. В то же время при заражении этими же штаммами вируса песцов у заболевших животных оксифильные включения отсутствуют. Эти данные отчетливо показывают, что один и тот же нейротропный вирус обладает различным цитоактивным действием на нервные клетки головного мозга в отношении образования оксифильных телец у различных видов животных.

При заражении песцов малопассажными штаммами вируса уличного бешенства у заболевших животных в нервных клетках аммонова рога и клетках Пуркинье мозжечка образуются включения, в то время, как указано выше, при инфицировании этих же животных малопассажными штаммами вируса «дикування» цитоплазматические включения отсутствуют. Эти наблюдения говорят о различном цитореактивном действии биологически очень близких нейровирусов бешенства и «дикування» в отношении образования оксифильных включений у одного и того же вида животных.

Оксифильные включения у белых мышей при обеих инфекциях имеются в пирамидных клетках аммонова рога, в нейронах коры больших полушарий, продолговатого мозга, гипоталамической области, сетевидного вещества мозгового ствола, чечевичеобразного ядра, а также в клетках Пуркинье мозжечка. При тех же самых условиях постановки опытов оксифильные включения у песцов при заражении малопассажными штаммами вируса бешенства находятся только в пирамидных клетках аммонова

рога, в нейронах коры больших полушарий и клетках Пуркинье мозжечка, и отсутствуют в других отделах головного мозга. Эти данные указывают на различное топографическое распределение включений у различных видов животных при заражении их одним и тем же нейровирусом.

При исследовании головного мозга песцов, зараженных малопассажными штаммами вируса уличного бешенства, обнаруживаются оксифильные включения, в то время как при заражении многопассажными штаммами этого же вируса (14—15 пассажей) включения не определяются. Это, по-видимому, следует связать с более быстрым фиксированием вируса уличного бешенства у песцов по сравнению с белыми мышами, у которых на этих пассажах фиксирование вируса не наступает.

Оксифильные включения у песцов имеют атипичное строение, которое заключается в том, что базофильная зернистость в них отсутствует.

Таким образом, изучение оксифильных включений при нейровирусных инфекциях, как бешенство и «дикування», показало, что они представляют собой реактивный процесс, направленный на отграничение вируса, а в некоторых случаях даже можно наблюдать выделение его из клетки. На характер реактивных изменений, наблюдающихся в нейронах, существенное влияние оказывают видовые особенности животного.

ЛИТЕРАТУРА

Канторович Р. А., Коновалов Г. В., Бузинов И. А., Рютова В. П. *Acta virologica*, 1963, 1, 6, 554. Коновалов Г. В. и Канторович Р. А. Сравнительно-морфологическое исследование цитоплазматических включений при бешенстве и «дикувании». Ежегодник ИЭМ, Л., 1963, т. VII—VIII, ч. 3, стр. 396. Соколов Н. Н. и Ванаг К. А. *Acta virologica*, 1962, 6, 452.

Goldwasser, R. A., Kissling R. E. *Proc. Soc. Exptl. Biol. and Med.*, Health Organization, 1959, 20, 579. Johnson H. Бешенство. В кн.: Вирусы и риккетсиозные инфекции человека, 1955, 303. Lepine P., Croissant O. *Ann. Inst. Pasteur*, 1951, 81, 1. Lepine P., Sautter V. *Ann. Inst. Pasteur*, 1946, 72, 174. Multon J. E. *Amer. J. Pathol.* 1954, 30, 533. Soufander P. J. *Pathol. and Bacteriol.*, 1956, 72, 257. Wolman M. and Behar A. *J. Infect. Dis.*, 1952, 91, 69.

CYTOLOGICAL AND CYTOCHEMICAL STUDIES ON REACTIVITY OF THE BRAIN NERVE CELLS INFECTED BY NERVE-VIRUSES

G. V. Konovalov

S u m m a r y

The present paper deals with reactivity changes in the nerve cells of the brain in polar foxes and white mice, infected with rabies and rabies-like nerve-viruses.

In the nerve cells of the brain of white mice infected with nerve-viruses were discovered oxyphile inclusions characterized by basophile granularity. The formation and development of the oxyphile inclusions was investigated in these animals. As revealed by cytochemical studies, these bodies contain DNA and RNA. Their formation and structure depends on species-specific qualities of animals. As concluded, the formation of the inclusions is a reactivity process of cells to segregate viruses.

ИЗУЧЕНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ВИРУСА И КЛЕТКИ МЕТОДОМ НИЗКОЧАСТОТНОЙ МИКРОКИНОСЪЕМКИ

В. Д. Быстров, В. Е. Пигаревский, Г. П. Жилова

Институт экспериментальной медицины АМН СССР, Ленинград

Преимущество метода микрокиносъемки перед методами цитологического и иммуногистохимического изучения фиксированных и окрашенных препаратов заключается в возможности непрерывного и длительного наблюдения за поведением клеток в условиях нормы и патологии.

В представленной работе излагаются результаты исследований по изучению взаимодействия вируса полиомиелита с клетками трипсинизованных тканевых культур при использовании метода микрокиносъемки.

Микрокинематографические исследования по изучению проблемы взаимодействия вируса и клетки были начаты в институте экспериментальной медицины в 1957 г. по инициативе проф. В. П. Михайлова. Моделью служила однослойная тканевая культура, полученная методом трипсинизации, которая выращивалась в жидкой питательной среде во флаконах Карреля высотой до 20 мм. При этом формирование слоя клеток происходило не на верхней поверхности стекла, как это имело место ранее, а на нижней. Съёмки производились при помощи инвертированного микроскопа фирмы «Рейхерт», в оптическую систему которого было включено фазово-контрастное устройство КФ-1. Микроскоп находился в специальном термостате при температуре 36—37° С. Для увеличения рабочего расстояния конденсора, расположенного в инвертированном микроскопе сверху, над столиком, пришлось удалить полусферическую фронтальную линзу; компенсация нарушенного хода лучей КФ-1 осуществлялась включением дополнительной фазовой кольцевой диафрагмы. С целью улучшения оптических свойств применяли зеленый светофильтр СЗС-1 или ЗС-1. Источником света служила лампа СЦ-115 (100 вт, 12 в). Съёмки производили на пленке Аэропанхром, А2 и МЗ-2. Частота съёмки была 1 кадр/20 сек., что дало ускорение процессов на экране в 480 раз.

Большие трудности представлял выбор флакона, пригодного для получения хорошего роста тканевой культуры и отвечающего необходимым оптическим требованиям (толщина стекла, на котором формируется слой клеток, не должна превышать 0,17 мм). Мы остановились на модели чашки Карреля с двумя отверстиями в верхней и нижней плоскостях диаметром около 1 см. На отверстия наклеивали с помощью парафина и ряда других веществ покровные стекла толщиной 0,17 мм. Преимуществом такой камеры является значительный объем (до 10 мл), позволяющий вводить до 3,0—5,0 мл питательной среды, что имеет важное значение при длительном наблюдении за культурой, обеспечивая необходимые условия для ее нормального развития.

В каждый флакон вводили суспензию, содержащую до 1—1,5 млн. клеток в 3 мл. среды 199 Паркера с 10—15% сыворотки животных или человека или солевой раствор Хенкса с гидролизатом лактальбумина и указанным количеством сыворотки. Съемку начинали после прикрепления клеток к поверхности стекла.

Полученные результаты

1. Характеристика незараженных тканевых культур.

Для съемки были использованы первичные культуры из эмбриональной ткани человека и куриного эмбриона и перевиваемые штаммы амниотических клеток человека (культура Детройт-6) и почечных клеток морской свинки.

Особенностью первичных культур из эмбриональных тканей явилось наличие значительного количества клеток, по-видимому, поврежденных в процессе трипсинизации. Другой их особенностью было наличие свободно передвигающихся клеток. Культура представляла собой скопление клеток (рис. 1), различных по величине и форме, среди которых значительную часть составляли длинные вытянутые клетки, не дающие сплошного слоя (как это наблюдалось у перевиваемых клеток). Исследования, выполненные под руководством В. П. Михайлова, показали, что культуры из эмбриональной человеческой ткани носят смешанный характер и состоят из фибробластов, преобладающих в количественном отношении, и мышечных элементов. В подтверждение наблюдений К. И. Пыльдвере (1963) мы смогли установить, что в однослойных трипсинизированных культурах фибробласты представляют собой одноядерные клетки неправильной формы с мелкозернистой цитоплазмой, содержащей иногда значительное количество вакуолей. Мышечные элементы представляются в виде длинных протоплазматических тяжей.

В отличие от данных, полученных различными авторами при

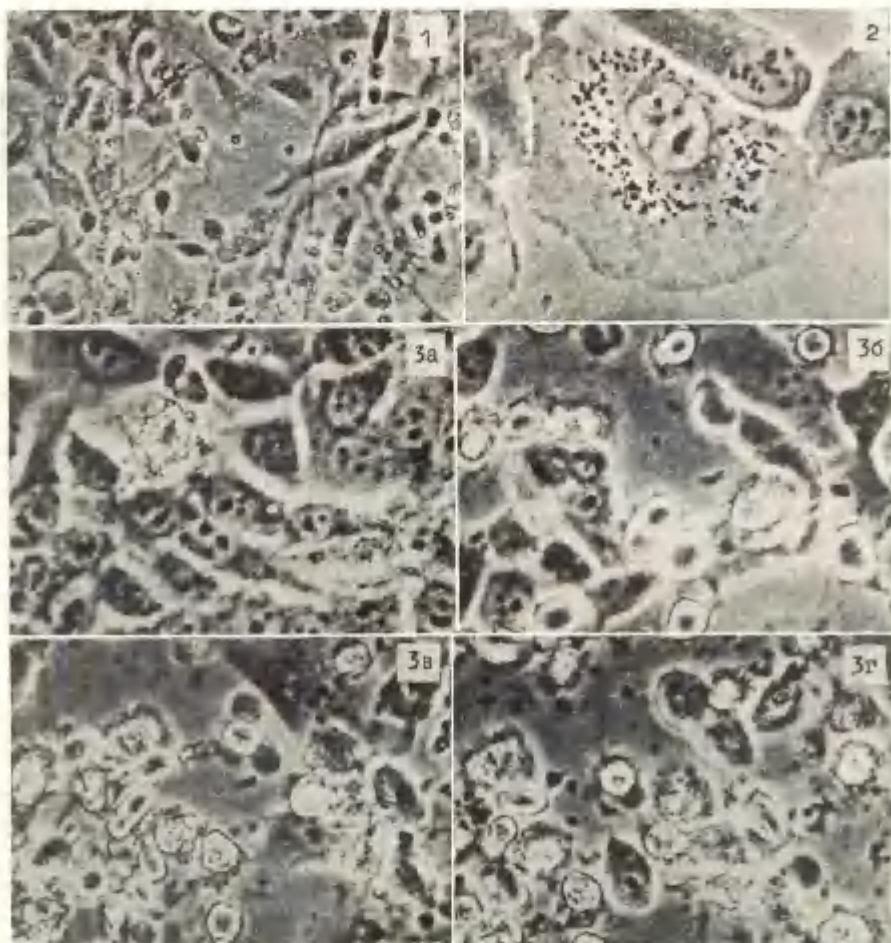


Рис 1. Первичная тканевая культура куриных фибробластов.

Ув. $\Phi\text{К} \times 20$, ок. 4.

Рис. 2. Клетка перевиваемой культуры амниотического эпителия человека.

Ув. $\Phi\text{К} \times 20$, ок. 7.

Рис. 3. Различные стадии морфологических изменений культуры амниотического эпителия, вызванные действием вируса полиомиелита: а — культура через 1 час после заражения вирусом, б — через 79 ч. дискомплексация культуры, в — через 18 ч. пузырьковой феномен, г — через 24 ч. незавершенный митоз.

изучении фиксированных гистологических препаратов, метод микрокинсьемки позволил наблюдать в динамике все стадии митоза клеток, вращение ядер, «вскипание» цитоплазмы, перемещение различных гранул в цитоплазме, напоминающее броуновское движение, а также энергичные перемещения не прикрепившихся к стеклу клеток и образований, напоминающих детрит.

В культуре человеческих эмбриональных клеток первой генерации, полученной снятием первично засеянных клеток трипсином или версеном, было мало поврежденных клеток. Однако здесь клетки не давали сплошного слоя и отличались подвижностью, затруднявшей наблюдение.

Клетки перевиваемых тканевых культур отличались однородностью форм, давали сплошной слой. Культура почти не содержала разрушенных клеток или их осколков. Клетки не выходили за пределы наблюдаемого участка и не содержали обильного количества вакуолей, затруднявших анализ зараженных вирусом культур.

Наиболее отчетливо движение различных структурных компонентов клетки мы наблюдали на модели клетки амниотического эпителия, снятой при увеличении ФК 20 (рис. 2), когда были видны волнообразные движения кортикального слоя цитоплазмы, движение различных включений.

После изучения особенностей поведения нормальных незараженных тканевых культур мы перешли к наблюдениям за клетками амниотического эпителия, зараженными вирусом полиомиелита.

2. Морфологические изменения клеток амниотического эпителия, зараженных вирусом полиомиелита.

В работе применяли вирус полиомиелита 1-го типа, аттенуированный А. Себиным. Мы изучили действие двух доз вируса 5000 ИД и 5 000 000 ИД, вводимых во флаконе в объеме 5,0 мл среды 199.

При многократном просмотре кинокадров и изучении фиксированных препаратов были получены данные, подтверждавшие наблюдения А. И. Дробышевской и В. П. Михайлова (1957), Л. В. Колесникова (1958) о дискомплексации и распаде однослойной тканевой культуры под влиянием вируса полиомиелита на отдельные округлые клетки с резко пиронинофильной цитоплазмой и сморщенным, бесструктурным ядром (рис. 3а, б, в, г). В дополнение к известным фактам удалось отметить, что вирус полиомиелита может обладать свойствами митотического яда, парализуя процесс непрямого деления клеток в его последней фазе (телофазе) (рис. 3г). В результате возникают картины незавершенных митозов. Первые фазы такого процесса мало чем отличаются от того, что свойственно митотически деля-

щимся клеткам контрольных тканевых культур. В стадии про-
фазы клетки увеличиваются в объеме, и форма их становится
близкой к сферической. После целого ряда сложных внутрикле-
точных изменений, почти неуловимых из-за использованных при
съемке относительно небольших увеличений микроскопа (ФК-20
ок. 4), наступает стадия метафазы, характеризующаяся появле-
нием экваториальной пластинки хромосом. После расхождения
хромосом образуются два коротких темных хромосомных конуса
у двух полюсов клетки. В цитоплазме появляется перетяжка,
которая постепенно углубляется, однако разделение исходной
клетки на две дочерних не происходит. Клеточные ядра превра-
щаются в плотные комочки хроматина, затем происходит полное
разрушение двух соединенных друг с другом клеток, либо одной
из них. Такое действие вирус полиомиелита оказывает в период
выраженного распада культуры. В культурах, зараженных виру-
сом независимо от дозы, в начальных стадиях сохраняется высо-
кая митотическая активность клеток, без признаков нарушения
митотического процесса.

По данным некоторых авторов (Львов и др. — Lwoff a. oth.,
1955), выделение вируса полиомиелита из клеток в жидкую
питательную среду осуществляется за счет повышенной актив-
ности периферических участков цитоплазмы с последующим их
лизисом. Однако наши наблюдения показали, что следует с из-
вестной осторожностью оценивать изменения в клетках ткане-
вых культур, зараженных различными вирусами, в том числе
вирусом полиомиелита. Оказалось, что отдельные клетки, пора-
женные вирусом полиомиелита, обнаруживают своеобразное
явление зернистого вскипания цитоплазмы и образования в ней
большого числа оптически плотных гранул. Гранулы эти пере-
мещаются к свободной поверхности клетки и в обратном направ-
лении, определяя возникновение множества мелких выступов
цитоплазмы, появляющихся и тут же исчезающих. Сходные
внутриклеточные изменения видны на фиксированных и окра-
шенных препаратах. Исходом такого процесса является восста-
новление обычного вида клетки с сохранением в цитоплазме
нескольких мелких гранул, находящихся в броуновском дви-
жении.

Эти наблюдения заставляют критически пересмотреть дан-
ные, полученные при изучении фиксированных и окрашенных
препаратов, объясняющих образование цитоплазматических вы-
ступов в клетке, как отображение процессов класматоза. Ни в
одном из фильмов мы не наблюдали чего-либо похожего на
отделение участков цитоплазмы от клетки. Образование выступ-
пов в цитоплазме было связано с энергичным ее движением
(т. е. процессом цитогранулокинеза).

Отмеченное явление можно было бы связать с патогенным
действием вируса полиомиелита на клетки тканевых культур.

Однако контрольные исследования показали, что процесс зернистого вскипания цитоплазмы в том виде, в каком он обнаруживается в однослойных тканевых культурах, зараженных вирусом полиомиелита, возникает и в тканевых культурах, не подвергавшихся никаким воздействиям. Процесс зернистого вскипания цитоплазмы (цитогранулокинез) имеет, по-видимому, вполне определенное, но пока еще неясное биологическое значение.

К числу изменений, обнаруженных в зараженных вирусом тканевых культурах, следует отнести так называемый «пузырьковый» феномен, напоминающий явление потоцитоза. «Пузырьковый» феномен выражается в появлении на свободной поверхности клеток крупных шарообразных выступов, наполненных жидким содержимым. По данным Барского, Робино, Эндо (Barski, Robineaux, Endo, 1955), указанные изменения отображают собой один из способов выделения вируса полиомиелита из цитоплазмы клеток тканевой культуры.

В соответствии с данными А. И. Дробышевской и В. П. Михайлова (1957), Данненбек (Duppenbascke, 1956), Барского и сотр. (1955) мы также не наблюдали одновременной гибели клеток даже при заражении 1,5 млн введенных во флакон клеток 5 млн ИД вируса. Нам не удалось выявить какие-либо существенные отличия в действии различных доз (большой и средней) вируса на клетки, за исключением быстроты наступления морфологических признаков в пласте, которые проявлялись раньше в культурах, зараженных большой дозой вируса.

При помощи замедленной микрокиносъемки А. Т. Кравченко, В. Н. Милютин, О. С. Гудима (1963) установили, что выход из клеток риккетсий и крупных вирусов осуществляется за счет своеобразного механизма вакуолизации цитоплазмы и отделения содержимого вакуолей в жидкую питательную среду культуры. После отделения риккетсий из цитоплазмы размеры лопнувшей вакуоли уменьшаются, целостность клеточной оболочки восстанавливается.

Сходство между цитопатогенным действием риккетсий Барнета (А. Т. Кравченко, В. Н. Милютин, О. С. Гудима, 1963) и вирусом полиомиелита выражается также наличием определенной последовательности гибели зараженной клетки. Полному распаду клетки часто предшествует более или менее длительный период двигательной активности — период «возбуждения». Поврежденная клетка отслаивается от стекла чашки Карреля и округляется. На ее свободной поверхности образуются шаровидные и булавовидные выступы цитоплазмы, заполненные жидким содержимым. Периодически сокращаясь, выступы цитоплазмы то увеличиваются, то уменьшаются. Затем происходит разрыв клеточной оболочки и жидкое содержимое цитоплазмы изливается в окружающую среду. Сразу же после этого актив-

ные движения цитоплазмы прекращаются и остатки клетки становятся неподвижными.

ЛИТЕРАТУРА

Дробышевская А. И. и Михайлов В. П. Цитопатологические изменения в однослойной культуре почечной ткани обезьян под влиянием вируса полиомиелита. Ежегодник ИЭМ АМН СССР за 1956, Ленинград, 1957, 438—447. — Колесников Л. В. Морфологические изменения однослойных культур из эмбриональной и амниотической тканей человека, зараженных вирусом полиомиелита. Ежегодник ИЭМ АМН СССР за 1957, Ленинград, 1958, 319—322. — Кравченко А. Т., Милютин В. Н. и Гудима О. С. Микрокиносъемка в биологии (цитология, вирусология, риккетсиология). Гос. изд. мед. литературы, Москва, 1963. — Пыльдвере К. И. О росте и превращении так называемой «кожно-мышечной ткани» в однослойной трипсинизированной культуре. Архив АГЭ, 1963, т. XIV, № 10, 20—24.

Barski G., Robineaux R., Endo M. Phase contrast cinematography of cellular lesion produced by poliomyelitis virus in vitro. Proc. Soc. expt. biol. med., 1955 33, 57—59. — Lwoff A., Dulbecco, Vogt M. and Lwoff M., Virology, 1955, 1, 128. — Duppenbacke T. H. Virology, 1956, 2, 811.

MICROCINEMATOGRAPHIC STUDY OF VIRUS-CELL INTERACTION

V. D. Bystrov, V. E. Pigarevski, G. P. Jilova

Summary

The cytopathic effect of poliomyelitis virus is characterized by break-up of tissue culture to rounded cells, destruction of the process of mitosis and the formation of vesiculi, like in a potocytosis. In the latent period of infection with polyomyelitis virus, the tissue culture cells preserve their mitotic activity. In the infected tissue cultures as well as in the control ones, the intracellular granules revealed rapid movement (cytogramulokinesis), the function of which is not clear.

НАРУШЕНИЕ И ВОССТАНОВЛЕНИЕ УЛЬТРАСТРУКТУР В ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЕ ПРИ ГИПЕРТЕР- МИИ И КИСЛОРОДНОМ ГОЛОДАНИИ

А. А. Манина, Р. П. Кучеренко

Лаборатория цитологии Института экспериментальной медицины АМН СССР

В настоящей работе проведен сравнительный анализ субклеточных изменений и процессов регенерации в клетках цнс при перегревании и кислородном голодании.

Исследование проведено на белых крысах. В опытах использованы взрослые, молодые, а также беременные животные и их потомство. Внешнему перегреванию животные подвергались в деревянном шкафу при постоянной температуре от 40 до 42° С по методике, разработанной П. Г. Светловым. Продолжительность опыта от 1 до 6 час. Кислородное голодание проводилось в барокамере пропусканием через сосуд, в котором находились крысы, струи газообразного азота, содержащего от 2,5 до 3% кислорода (по методике И. С. Репина, 1958). Фиксация, обработка материала, заливка в метакрилаты от экспериментальных и контрольных животных проводились одновременно по методу Паладе. Для анализа изменений митохондрий применено дифференциальное центрифугирование. Электронно-микроскопическому изучению подвергнуты различные участки коры головного мозга, мозжечка, а также спинной мозг крыс. Ультратонкие срезы изучались на электронном микроскопе УМВ-100 при 75 кв с электронно-оптическим увеличением от 6 до 30 тысяч и с последующим светооптическим увеличением. Изучение вышеуказанных воздействий на цнс животных проведено в различные сроки — от 30 минут до 10 суток.

Примененные внешние воздействия на организм животного вызывают реактивные процессы и структурные нарушения в его центральной нервной системе на субмикроскопическом уровне. Последние развиваются сразу после воздействия и выражаются различно, в зависимости от стадии и клеточной дифференциации.

Различные по характеру действия альтерерирующие агенты приводят к течению однотипных реактивных процессов и изменений

ультраструктур клеточных элементов в цнс, носящих неспецифический характер. Однако темпы их развития и распространенность определяются длительностью и характером воздействия.

Развитие и течение субклеточных реактивных процессов в цнс характеризуется сравнительно быстро сменяющимися стадиями. Вначале наступает стадия возбуждения, когда в ответ на раздражение проявляется защитно-приспособительная реакция, — мобилизация разнообразных клеточных механизмов для преодоления повреждения. Отчетливы структурные изменения и перегруппировка гранул РНП в ядре нейрона, концентрация их под оболочкой, а также повышение осмиофильности. Как известно, осмиофильные гранулы ядра соответствуют макромолекулам РНК (Портер — Porter, 1954, Галл — Gall, 1956, Цанев — Tsanev, 1961, Цанев и Марков, 1964).

Вслед за ранними изменениями в ядре развиваются нарушения цитоплазматических структур клетки. Они начинаются с реакции митохондрий. Последние округляются, в большей или меньшей степени разбухают, изменяется электронная плотность не только их матрикса, но и крист. Однако большая часть митохондрий сохраняет свою обычную структуру (рис. 1А, В). Отмечается расширение канальцев эндоплазматической сети. Отчетливо видна перегруппировка и конденсация нуклеопротеидных гранул, находящихся в цитоплазматическом матриксе, а также уменьшение их в количестве и увеличение в размерах. Следовательно, наиболее ранней и чувствительной реакцией на различные по характеру раздражители являются физико-химические изменения РНП в ядре и цитоплазме. Последние по данным Шабадша при радиационных поражениях цнс развиваются немедленно. Ранее одним из авторов (А. А. Манина, 1964) были описаны реактивные явления в нервных клетках после действия ионизирующей радиации, проявляющиеся в повышенном отложении базофильного вещества на мембране ядра. Методом авторадииграфии установлено неоднородное изменение нуклеопротеидного обмена нейронов в различные периоды после воздействия. Эти наблюдения вполне согласуются с установленными нами фактами изменения ультраструктур нервных клеток.

Представляет большой интерес реакция, проявляющаяся в расширении сосудов в ткани мозга; она наиболее резко выражена после гипертермии. Затем возбуждение нервной клетки сменяется ее угнетением. В ней развиваются трофические изменения. Размеры, форма и месторасположение ядрышка резко изменяются. Иногда грануляционные структуры объединяются группами и образуют конгломераты, которые отделяются от ядра и проникают в цитоплазму клетки. Иногда ядро теряет грануляционную структурность и становится гомогенным, особенно при гипертермии. Несомненно, что отмеченные субмикроскопические изменения в ядре характеризуют более резкие нару-



Рис. 1. ABCDE митохондрии головного мозга крыс. (Дифференциальное центрифугирование).

- А — контрольные животные
 В, С — перегревание в течение 2 часов
 В — сразу, С — через сутки после опыта.
 D, E — кислородное голодание в течение 3 часов:
 D — через сутки после опыта,
 E — через 3 суток после опыта
 Ув. 50 000.

шения синтеза и физико-химических свойств нуклеопротеидов в нейронах, чем на стадии возбуждения.

В цитоплазме субмикроскопические изменения усиливаются и наиболее резко проявляются в митохондриях. Электронная плотность значительного числа их повышается, утрачивается четкость структуры, происходят сморщивание и вакуолизация. Наружная двухконтурная оболочка сохраняется, но изменяется внутренняя форма. В результате набухания митохондрии и их кристы увеличиваются в размерах от $\frac{3}{4}$ до $\frac{1}{2}$ своей обычной величины, часть митохондрий разрушается. Особенно резко эта реакция выражена и прослеживается в специально выделенной фракции при дифференциальном центрифугировании (рис. 1С, Д). Подобные и более разнообразные картины нарушения структуры митохондрий описаны В. Ф. Машанским (1962; В. Ф. Машанский и К. А. Самойлова, 1964). Наблюдаемые изменения, несомненно, отражают более резкое нарушение метаболической активности нейрона, чем на стадии возбуждения. Необходимо отметить, что часть митохондрий не отличается от таковых в контроле, почти сохраняя свою обычную структуру. Митохондрии являются важнейшими органоидами (Грин, 1962), осуществляющими окислительные, энергетические, ферментативные процессы и синаптические связи в нервной клетке, и можно с уверенностью сказать, что их структурные изменения быстро приводят к нарушению нормальной жизнедеятельности нейрона.

Эргастоплазматические мембраны становятся слабо различимыми. Отмечается локальная дезорганизация нисслевского вещества с растворением гранул Паладе, перинуклеарные пространства значительно расширяются, и может наступать вакуолизация цитоплазмы, особенно при гипертермии. В глиальных элементах также отмечаются подобные ультраструктурные изменения, которые более резко выражены в микроглии. Вышеуказанные субмикроскопические изменения на стадии угнетения клетки в основном являются обратимыми и отражают реактивные процессы, развивающиеся в цнс.

Продолжительность течения стадии угнетения может быть различной в зависимости от длительности и силы действия раздражителя. Так, при длительности опыта с кислородным голоданием 3,5 часа (2,5% кислорода) только на третьи сутки наблюдаются постепенные сдвиги от угнетенного состояния к восстановлению нарушенных структур нервной клетки. Воздействие более слабое (3,5% кислорода) сокращает на сутки переход от угнетения к стадии регенерации. Удастся проследить постепенное восстановление нарушенных гранулярных структур РНП, а также мембранных образований, митохондрий и эргастоплазматической сети нейрона к обычному состоянию (рис. 1Е). Восстановление субклеточных структур прослеживается одновременно в митохондриях и ядре. Следовательно,

процессы регенерации ультраструктур нервной клетки неотделимы от предшествующих им деструктивных изменений. Потенция нейрона к регенерации нарушенных ультраструктур на молекулярном уровне проявляется различно. Малые повреждения, сводящиеся к перегруппировке, конденсации и количественным изменениям гранул РНП, а следовательно к изменению физико-химических свойств нейрона, сохраняющего способность к синтезу, и не сопровождающиеся деструкцией митохондрий и эргастоплазмы, — репарируются в короткие сроки, в течение часов и суток. Обратимость повреждения клетки после воздействия раздражителем происходит за счет восстановления ее нарушенных ультраструктур. В этом случае несомненно проявляется авторегуляция клетки, ее удивительная способность использовать все ресурсы, которые необходимы для нормальной жизнедеятельности, ликвидировать нанесенное повреждение и возвращаться к норме. Эта особенность имеет исключительное значение в цнс, где физиологическая регенерация протекает на субклеточном уровне. Более распространенные повреждения ультраструктур нейрона, сопровождающиеся деструкцией митохондрий и эргастоплазмы, а также резкой дезорганизацией нислевского вещества, репарируются медленнее; процессы восстановления протекают в течение 5—10 дней. У взрослых животных, подвергнутых воздействиям в эмбриогенезе, отчетливых поражений в митохондриях и эргастоплазме нейрона не наблюдалось, хотя их электронно-оптическая плотность и плотность гранул РНП ядра в группах клеток отличалась от нормы.

Таким образом, проведенное нами субмикроскопическое исследование цнс на различных стадиях в разные промежутки после кратковременного воздействия различными альтерирующими агентами позволило проследить в определенной последовательности не только деструктивные изменения ультраструктур нервной клетки, но и быстро наступающие затем процессы регенерации на субклеточном уровне, с восстановлением нормальных физико-химических и ядерно-плазматических отношений.

Однако восстановление нарушенных структур клетки при вышеуказанных воздействиях может не наступать. На стадии тканевой дифференциации так же, как показано при помощи светового микроскопа (Хикс и др., — Hicks a. oth., 162; А. А. Манина, 1960; Р. П. Кучеренко, 1964), невробластические элементы оказываются чрезвычайно чувствительными к различным воздействиям. Развитие реактивных процессов на субклеточном уровне в этот период происходит однотипно с вышеописанными. Однако на стадии угнетения отмечаются очень резкие и быстрые сдвиги в физико-химических свойствах РНП ядра и цитоплазмы, вследствие чего клетка теряет способность к синтезу и восстановлению. Характерные гранулярные структуры

исчезают, ядро становится плотно гомогенным, стадия пикноза быстро сменяется некробиотическими изменениями. Митохондрии, представляющие метаболический аппарат, разрушаются. Ядерная и клеточная оболочки исчезают, эндоплазматический ретикулум совершенно утрачивает свою внутреннюю структуру, становится гомогенным и распадается, а вслед за этим погибает и ядро.

Полученные нами ультраструктурные данные о физико-химических изменениях РНП в ядре и цитоплазме нейрона на молекулярном уровне находятся в полном соответствии с результатами биохимических исследований (Паладе — Palade, 1955; 1956). Сущностью процессов регенерации в цнс является восстановление нарушенных ультраструктур и ее функций. Одним из наиболее ярких и широко распространенных тестов репарации повреждений в цнс является обратимость ее функциональной деятельности.* Оказывается, что у исследованных нами животных более резкие нарушения деятельности цнс обнаруживаются у взрослых крыс, подвергнутых гипертермии в эмбриогенезе.

При выработке пищевых условных рефлексов (в течение 62 опытов на каждой крысе), скорость пробежки экспериментальных животных до пищи в простой ситуации — по прямой линии — в первой декаде колебалась от 20,2 до 84 сек, а в контроле от 9,1 до 9,5 сек. К концу третьей декады эти различия сближались. Более существенные функциональные изменения отмечаются у опытных крыс при выработке у них пищевых условных рефлексов в сложном семиходовом лабиринте. Скорость пробежки животных до пищи на 30 день опыта составляла от 22,8 до 199 сек, в контроле от 7,8 до 8,3 сек. Идентичные результаты получены у взрослых и молодых крыс, облученных в эмбриогенезе (А. А. Манина, 1964б).

У взрослых животных, подвергнутых перегреванию в эмбриогенезе, резко нарушена синтетическая деятельность головного мозга. Это проявлялось в заторможенности движений, плохой ориентации в сложном лабиринте при пробежке к пище, а также в появлении подкорковых реакций (умывание, чесание и др.).

У части крыс, подвергнутых перегреванию, наблюдалось нарушение двигательных реакций в виде подтягивания задних лап, как у лягушек. Характерно, что в поведении этих животных также отмечалась неряшливость: были взлохмоченными и нечистыми, их кормушки вместе с пищей постоянно заполнялись грязью. Наши исследования согласуются с данными других авторов (И. А. Пионтовский и И. А. Коломийцева, 1959; Светлов с соавт., 1960).

* Эта часть нашей комплексной работы выполнена по методу П. С. Купалова его сотрудницей О. Н. Воеводиной. За интерес к нашей работе и постоянное сотрудничество приносим благодарность О. Н. Воеводиной.

Таким образом, несмотря на высокую приспособленность нервной клетки переносить неблагоприятные условия и противостоять повреждающим воздействиям, а также отчетливую репарацию ее ультраструктур, сохраняются значительные функциональные изменения цнс, которые являются закономерными для животных, подвергнутых различным по механизму воздействиям.

Следует учитывать в лечебно-профилактических целях, что даже однократное перегревание крыс, особенно в период эмбриогенеза, вызывает субклеточные нарушения, приводящие к резким изменениям функциональной деятельности цнс животных и их потомства.

ЛИТЕРАТУРА

- Грин Д. В кн.: Структурные компоненты клетки. М., 78—101, 1962. — Кучеренко Р. П. ДАН СССР, 156, 1, 230, 1964. — Манина А. А. Архив анат., гистол и эмбриол., 11, 33—43, 1960. — Манина А. А. Лучевые поражения и восстановительные процессы в центральной нервной системе. Изд. «Медицина», 1964а. — Манина А. А. Morphological alterations and regenerative processes in the developing mammalian CNS as influenced by α -, β - and γ -radiation. Experimental embryology and neuroanatomy. Proc. of a Symp. held in Prague on November 12th—13th, 1962. Prague, 1964б. — Машанский В. Ф. Цитология, 4, 4, 1962. — Машанский В. Ф. и Самойлова К. А. Цитология, 6, 1, 1964. — Пионтковский И. А. и Колосийцева И. А. Бюлл. exper. биол. и мед., 48, 12, 25—30, 1959. — Репин И. С. Ежегодник ИЭМ за 1958 г., 119. — Светлов П. Г. с соавт. Ежегодник ИЭМ АМН СССР за 1959, Л., 455—463, 1960. — Цанев Р. Г. и Марков Г. Г. Биохимия клеточного деления. Л.—М., 1964. — Gall J. G. J. Biophys. a. Biochem. Cytol., 2, 393—396, 1956. — Hicks S., D'Amato C., Jorges D. Proc. of the Symp. on the effects of ionising radiation on the nervous system. Vienna, 199—205, 1962. — Palade G. E. J. Biophys. a. Biochem. Cytol., 1, 59—68, 1955. — Palade G. E. J. Biophys. a. Biochem. Cytol., 2 (suppl.), 85—98, 1956. — Porter K. R. J. Histochem. a. Cytochem., 2, 346—373, 1954. — Tsanev P. Folia Morphologica, XII (XX), 2—3, 170—178, 1961.

ULTRASTRUCTURAL CHANGES AND REPARATION IN THE CENTRAL NERVOUS SYSTEM CAUSED BY HYPERTHERMY AND HYPOXY

A. A. Manina and R. P. Kucherenko

Summary

A comparison of ultrastructural reactive responses to hyperthermy and hypoxia shows remarkable similarities. Cells show a considerable capacity for reparation after being injured.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПРЕДИСЛОВИЕ	3
Ю. К. Кярнер. Цитологические особенности клеток первичных одно- слойных тканевых культур	4
J. Kärner. Cytological characteristics of the fibroblasts of monolayer primary cultures. <i>Summary</i>	15
Ю. П. Хуссар. О лимфоцитопозе и рециркуляции лимфоцитов в тимусе цыплят	16
Ü. Hussar. On the recirculation of lymphocytes in chicken thymus. <i>Summary</i>	24
А. Ю. Труупыльд. Морфологические проявления суточных биологических ритмов в коре надпочечников крыс	25
A. Truupöld. Morphological characteristics of the daily biological rhythm. <i>Summary</i>	32
А. В. Журавлев. О суточном ритме митотической активности в переход- ном эпителии мочевого пузыря	33
A. V. Zhuravlev. Daily frequency of mitotic activity in transitional epithelium of the bladder. <i>Summary</i>	38
К. М. Светикова. Репаративная регенерация кожного и кишечного эпителиев при различных условиях облучения	39
K. M. Svetikova. Reparative regeneration of skin and intestine epithelia under various conditions of irradiation. <i>Summary</i>	47
В. И. Булгак. Пролиферация клеток облученной печени, имплантиро- ванной в очаг асептического воспаления	48
V. J. Bulgak. Proliferation of irradiated hepatic cells implanted into the focus aseptic inflammation. <i>Summary</i>	53
Г. Н. Воронин, З. П. Касумова-Михальская. Морфологические изме- нения в тканях поджелудочной железы и печени в предиабе- тическом состоянии	54
G. N. Voronin, Z. P. Kasumova-Mikhalskaya. Morphologic changes in the pancreas and the liver in a prediabetic state. <i>Summary</i>	60
Е. Н. Никифорова. Репаративная регенерация тканей молочной железы у овариэктомированных животных	61
E. N. Nikiforova. The reparative regeneration of tissues of the mammary gland in ovariectomized animals. <i>Summary</i>	66
С. Я. Марамаа. Восстановительные процессы в миокарде при адренали- новой миокардиодистрофии	67
S. Maramaa. Reparative processes in the myocardium during epinephrine myocardiodystrophy. <i>Summary</i>	72
Т. Ф. Вельгре, А. А. Липпинг, Э. С. Сепп, У. Р. Труупыльд. Регене- рация аорты после аллопластики	73
T. Velgre, A. Lipping, E. Sepp, U. Truupöld. On the regeneration of aorta following an alloplastic operation. <i>Summary</i>	81
М. Д. Тилева. Рост и превращение эпителиев матки и влагалища крыс в очаге асептического воспаления	82
M. D. Tileva. Growth and transformation of uterine and vaginal epithelia of rat in the focus of aseptic inflammation. <i>Summary</i>	88

М. Х. Вийкмаа. Изменения влагалищного эпителия в органотипических культурах	89
M. Viikmaa. Alterations of vaginal epithelium in some experimental conditions. <i>Summary</i>	93
А. Г. Бобков. Структура первичных мезотелиом в связи с вопросом о гистобластических потенциях целомического эпителия	95
A. G. Bobkov. The structure of primary mesotheliomas in connection with the histoblastic properties of celomic epithelium. <i>Summary</i>	102
С. А. Вероман. О клеточных типах первичных тканевых культур почки	103
S. Veroman. The cell types in primary trypsinized kidney culture. <i>Summary</i>	107
К. И. Пыльдвере. Проблема биологической специфичности глиоэпендимальной ткани	108
K. Põldvere. The problem of the biologic specificity of glio-ependymal tissue. <i>Summary</i>	120
М.-А. А. Кооль. Рост и превращение покровных клеток сосудистого сплетения мозга в первичных тринсинизированных культурах	121
M.-A. Kool. Growth and transformation of the covering cells of the vascular plexuses of the brain in primary trypsinized cultures. <i>Summary</i>	126
Ю. М. Жаботинский, В. Ф. Мельникова. Значение периаксональных изменений периферических нервных волокон для изучения процессов демиелинизации	127
J. M. Jabotinsky, V. E. Melnikova. Significance of periaxonal changes in peripheral nerve fibres for the study of the demyelination process. <i>Summary</i>	134
Г. В. Коновалов. Цитологическое и гистохимическое изучение реактивных процессов в нейронах головного мозга при нейровирусных инфекциях	135
G. V. Konovalov. Cytological and cytochemical studies on reactivity of the brain nerve cells infected by nerve-viruses. <i>Summary</i>	140
В. Д. Быстров, В. Е. Пигаревский, Г. П. Жилова. Изучение взаимодействия вируса и клетки методом низкочастотной микрокиносъемки	141
V. D. Bystrov, V. E. Pigarevski, G. P. Jilova. Microcinematographic study of virus-cell interaction. <i>Summary</i>	146
А. А. Манина, Р. П. Кучеренко. Нарушение и восстановление ультраструктур в центральной нервной системе при гипертермии и кислородном голодании	147
A. A. Manina, R. P. Kucherenko. Ultrastructural changes and reparation in the central nervous system caused by hyperthermy and hypoxu. <i>Summary</i>	152

Труды по тканевой биологии

I

На русском языке

Резюме на английском языке

Тартуский государственный университет
ЭССР, г. Тарту, ул. Юликооли, 18

Ответственный редактор К. Пыльдвере

Корректоры А. Правдин и О. Мутт

Технический редактор О. Правдин

Сдано в набор 12/X 1965 г. Подписано к печати
26/X 1966 г. Бумага фабрики «Кохила», типограф-
ская № 3, 60 × 90, 1/16. Печ. листов 9,75 + 24 вклей-
ки. Учетн.-издат. листов 12,4. Тираж 750 экз.

Заказ № 7747. МВ-09862.

Типография им. Ханса Хейдеманна, ЭССР,
г. Тарту, ул. Юликооли, 17/19.

Цена 1 руб. 7 коп.

ОПЕЧАТКИ

Стр.	Строка	Напечатано	Следует читать
5	13 сверху	деакцией	реакцией
5	16 сверху	фсофатаза	фосфатаза
8	17 снизу	останется	остается
24	4 сверху	геопата	neopatal
39	7 снизу	ценкер-формоле	Ценкер-формоле
53	15 снизу	tothe	to the
58	вклейка	β — клетки	β -клетки
77	17 снизу	позднее	поздние
80	5 снизу	vesel	vessel
84	6 сверху	окрашивающаяся	, окрашивающуюся
84	7 сверху	количество	количества
84	13 снизу	Яровславцевой	Ярославцевой
97	13 сверху	просвет	просветы
108	6 снизу	Н. П. Хлопина	Н. Г. Хлопина
118	6 сверху	Q. Bartoli	E. Bartoli
118	9 сверху	menengiomata	meningiomata
118	23 сверху	Daersto-Mogud	Daroto-Moguel
123	13 снизу	клеточным мембраном	в клеточных мембранах
134	19 сверху	Iystom. (Oxford Univ	System. Oxford Univ.